



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia**  
**Universidade Técnica de Lisboa**

# **PRODUÇÃO DE SUCEDÂNEOS DE GORDURA DE LEITE MATERNO ENRIQUECIDOS EM ÁCIDOS GORDOS POLINSATURADOS ÓMEGA-3, CATALISADA POR ENZIMAS TERMOESTÁVEIS IMOBILIZADAS**

**Joana Rita Inês da Silva**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientador: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias

Co-orientador: Mestre Carla Sofia Ramos Tecelão

## **Júri:**

Presidente: Doutor Bernardo Manuel Teles de Sousa Pacheco de Carvalho, Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: - Doutora Maria Henriques Lourenço Ribeiro, Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa;

- Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Mestre Carla Sofia Ramos Tecelão, Assistente da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria, na qualidade de especialista.

Lisboa, 2009





Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia**  
**Universidade Técnica de Lisboa**

# **PRODUÇÃO DE SUCEDÂNEOS DE GORDURA DE LEITE MATERNO ENRIQUECIDOS EM ÁCIDOS GORDOS POLINSATURADOS ÓMEGA-3, CATALISADA POR ENZIMAS TERMOESTÁVEIS IMOBILIZADAS**

**Joana Rita Inês da Silva**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientador: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias

Co-orientador: Mestre Carla Sofia Ramos Tecelão

## **Júri:**

Presidente: Doutor Bernardo Manuel Teles de Sousa Pacheco de Carvalho, Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: - Doutora Maria Henriques Lourenço Ribeiro, Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa;

- Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Mestre Carla Sofia Ramos Tecelão, Assistente da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria, na qualidade de especialista.

Lisboa, 2009

## AGRADECIMENTOS

Agradeço de uma forma muito especial à Professora Doutora Suzana Ferreira Dias, pela sua amizade, pelos conhecimentos transmitidos e pela inteira e constante disponibilidade e optimismo. Obrigado, Professora.

À Mestre Dr<sup>a</sup> Carla Tecelão, que me co-orientou neste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, pela realização das análises dos ésteres metílicos por cromatografia gasosa de todas as amostras deste estudo, pelas palavras de optimismo e força e pela sua extrema simpatia.

A todos os elementos docentes e não docentes, e às minhas queridas colegas do Departamento de Agro-Indústrias, com quem convivi durante todo o percurso deste trabalho, dirijo um agradecimento colectivo.

Ao meu padrinho que, de uma maneira ou outra, sempre apoiou as minhas decisões ajudando em tudo o que me foi preciso, durante a minha vida universitária.

A todos os meus amigos, todos eles muito especiais, que sempre me apoiaram nos bons e maus momentos da minha vida. João, obrigada pela tua preciosa ajuda. Um muito obrigada a todos.

E por último, mas longe de ser o menos importante, ao Igor, que esteve sempre e incondicionalmente do meu lado. Sem a sua presença na minha vida muitas coisas não seriam possíveis. Obrigada pela pessoa que és.

## RESUMO

Na gordura do leite materno (HMF), o ácido palmítico (20-30%) encontra-se principalmente na posição interna dos triacilgliceróis, enquanto os ácidos gordos insaturados estão nas posições externas.

Neste estudo pretendeu-se produzir substitutos de HMF por interesterificação da tripalmitina com ácidos gordos polinsaturados ómega-3 (ómega-3 PUFA), principalmente DHA (ácido docosa-hexenóico) e EPA (ácido eicosapentenóico), catalisada enzimaticamente, em meio sem solvente.

Testaram-se as lipases comerciais imobilizadas “Lipozyme RMIM™”, “Lipozyme TLIM™” e “Novozym 435™”, de Novozymes, e a lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis* imobilizada em Accurel MP 1000.

Após 24h de reacção a 60°C, verificou-se a maior incorporação molar para a “Novozym 435™” (26,1%) e “Lipozyme RMIM™” (20,8%), em contraste com a enzima *Candida-parapsilosis* (8,5%) e “Lipozyme TLIM™” (8,2%). A actividade de interesterificação variou com os biocatalisadores e revelou-se independente da sua actividade hidrolítica. Em ensaios de reutilização sucessiva, a “Lipozyme RMIM™” revelou uma desactivação linear (tempo de meia vida,  $t_{1/2}$ =276h), enquanto a enzima *C.parapsilosis* apresentou uma desactivação em série ( $t_{1/2}$ =127h).

Modelou-se a interesterificação catalisada pela “Lipozyme RMIM™”, em função da temperatura (58°C-72°C) e da razão molar tripalmitina:ómega-3 PUFA (1:2-1:4). A incorporação aumentou com a temperatura e razão molar.

A selecção do biocatalisador deve ser feita em função da sua actividade de interesterificação e da estabilidade operacional.

**Palavras-chave:** ácidos gordos polinsaturados ómega-3, estabilidade operacional, interesterificação, lípidos estruturados, metodologia das superfícies de resposta, substitutos da gordura do leite materno.

## ABSTRACT

In human milk fat (HMF), palmitic acid (20-30%) is mostly esterified at the internal position of triacylglycerols, while unsaturated fatty acids are at the external positions.

This study aims at the production of HMF substitutes by enzyme-catalyzed interesterification of tripalmitin with omega-3 polyunsaturated fatty acids (omega-3 PUFA), mainly DHA (docosahexenoic acid) and EPA (eicosapentenoic acid), in solvent-free media.

Interesterification activity of commercial immobilized lipases “Lipozyme RMIM™”, “Lipozyme TLIM™” and “Novozym 435™” (Novozymes) and *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase immobilized on Accurel MP 1000 was evaluated. After 24-h reaction at 60°C, the highest incorporations were observed with “Novozym 435™” (21.6%) and “Lipozyme RMIM™” (20%), in contrast with *C. parapsilosis* enzyme (8.5%) and Lipozyme TLIM (8.2%). Interesterification activity showed to depend on the biocatalyst itself and not related with the hydrolytic activity. In consecutive reutilizations, “Lipozyme RMIM™” showed a linear deactivation kinetics (half-life time,  $t_{1/2}$ =276h) and *C. parapsilosis* enzyme presented series-type deactivation kinetics ( $t_{1/2}$ =127h).

Modelling of interesterification catalysed by “Lipozyme RMIM™”, as a function of temperature (60°C-70°C) and molar ratio tripalmitin:omega-3 PUFA (1:2.3-1:3.7) was performed. The incorporation linearly increased with both temperature and molar ratio.

The selection of the adequate biocatalyst must be performed on the basis of its catalytic activity and operational stability.

**Keywords:** human milk fat substitutes, interesterification, omega-3 polyunsaturated fatty acids, operational stability, response surface methodology, structured lipids.

## LONG ABSTRACT

The human milk is a functional and natural food with 4-5% of fat which provides to infants the most fraction of energy needed, as well as some nutrients and other important components (Xu, 2000; O'Shea *et al.*, 2005). For this reason, the human milk is the best infant food, since it is natural, nutritionally and immunologically perfect (Megraud *et al.*, 1990). However, some children can not be breastfed for many reasons which are inherent to the mother's inability. In these situations it is necessary to prepare milk formulations capable to provide the nutritional components to fast infant's growth (Forsyth, 1998). Thus, it is important that this milk formulations have the same lipidic composition as that found in human milk fat (HMF).

The HMF consists of long fatty acids chains, such as the oleic (30-35%), palmitic (20-30%), linoleic (7-14%) and stearic (5.7-8%) acids and also small amounts of omega-3 polyunsaturated fatty acids (omega-3 PUFA), such as the EPA (C<sub>20:5</sub>, 0.07-0.18%) and DHA (C<sub>22:6</sub>, 0.26-0.41%) (Akoh, 2002; Akoh e Xu, 2002).

The human milk is rich in calcium and energy which are essential, to infant growth, to reduce the occurrence of colic and obstipation and to the absorption of several vitamins and minerals ([www.lipidnutrition.com](http://www.lipidnutrition.com), ref:540-2-200809).

In human milk fat (HMF), unlike in vegetable oils and in cow's milk fat, palmitic acid (20-30%), the major saturated fatty acid, is mostly esterified at the internal position of triacylglycerols, while unsaturated fatty acids are at the external positions. The palmitic acid location in sn-2 position of the human milk fat TAG increases the fatty acids absorption in infants's intestine and decreases the loss of calcium in their feces (Jensen, 1989; Innis *et al.*, 1995; Quinlan *et al.*, 1995; Kennedy *et al.*, 1999, Xu, 2000). Thus, the use of both vegetable oils and cow's milk as human milk fat substitutes in infant's formulations can cause a deficit of calcium and fatty acids absorption (Innis, 1995; Xu, 2000; O'Shea, 2005). This is due to the formation of insoluble calcium salts with saturated fatty acids (e.g. calcium palmitate) which are released by the action of pancreatic lipase 1,3 during digestion.

Nowadays, the commercial product named "Betapol" is used as human milk fat substitute. It is formed by triacylglycerols mainly OPO (oleic acid in extremities positions), (-sn-1 e sn-3-), and the palmitic acid in TAG's internal position, (-sn-2-), obtained by interesterification of natural vegetable oils, catalysed by a 1,3 specific lipase. After the reaction, the free fatty acids in excess are removed by distillation, and the residual tripalmitin is separated by crystallization. This product is produced by "Lipid Nutrition", Wormerveer, in the Netherlands.

In the area of oils and fats, the use of lipases as catalysts for the production of structured lipids with functional and specific properties has greatly increased during the last decades.

The inorganic catalysts have been replaced by lipases because of enzymatic benefits with respect to chemical processes (Xu, 2000).

The lipases are enzymes which catalyze the hydrolysis of esters in aqueous medium. However, when these enzymes are in organic media with low water activity, they catalyze both esterification and interesterification reactions (Kazlauskas and Bornscheuer, 1998). Lipase-catalyzed reactions occur under mild conditions (temperature <70°C and atmospheric pressure) and with higher selectivity than with the inorganic catalysts.

The production of modified TAG in their fatty acid composition is currently performed by the acidolysis reaction between an ester and a free fatty acid. The HMFS produced by enzymatic route are among the most important structured lipids for the Food Industry. The use of 1,3 selective lipases for the production of HMFS will maintain the palmitic acid in the internal position of acylglycerols which is nutritionally desirable and it is not possible by the chemical route.

The omega-3 PUFA enrichment in infant milk formulations, mainly in DHA (docosahexenoic acid), has known benefits in the infants' brain and nervous system development. There are some studies which show that infants who were fed with human milk revealed during the childhood and latter years, 5-12 more points in IQ than the infants that were fed with conventional milk formulations (Sahin *et al.*, 2006). Moreover, the DHA looks to be the human milk substance responsible for the improvement in IQ values (Horrocks and Yeo, 1999).

This study aims at the production of HMF substitutes by enzyme-catalyzed interesterification of tripalmitin with omega-3 polyunsaturated fatty acids (omega-3 PUFA), mainly DHA and EPA (eicosapentenoic acid), in solvent-free media.

Intesterification activity of commercial immobilized lipases "Lipozyme RMIM™", "Lipozyme TLIM™" and "Novozym 435™" (Novozymes) and *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase immobilized on Accurel MP 1000 was evaluated. After 24 h reaction at 60°C, the highest incorporations were observed with "Novozym 435™" (21.6%) and "Lipozyme RMIM™" (20%), in contrast with *C. parapsilosis* enzyme (8.5%) and Lipozyme TLIM (8.2%). Intesterification activity showed to depend on the biocatalyst itself and not related with the hydrolytic activity.

In batch operational stability studies, "Lipozyme RMIM™" showed a linear deactivation kinetics (half-life time,  $t_{1/2}$ =276 h) and *C. parapsilosis* enzyme, presented series-type deactivation kinetics ( $t_{1/2}$ =127 h).



Modelling of interesterification reaction catalysed by “Lipozym RMIM™”, as a function of temperature (60°C-70°C) and molar ratio tripalmitin:omega-3 PUFA (1:2.3-1:3.7) was carried out. Omega-3 PUFA incorporation linearly increased with both temperature and molar ratio.

The selection of the adequate biocatalyst must be performed, not only on the basis of its catalytic activity, but also on its operational stability.

## ÍNDICE GERAL

|  |            |
|--|------------|
| <b>AGRADECIMENTOS</b>  | <b>i</b>   |
| <b>RESUMO</b>  | <b>ii</b>  |
| <b>ABSTRACT</b>  | <b>iii</b> |
| <b>LONG ABSTRACT</b>   | <b>iv</b>  |
| <b>ÍNDICE GERAL</b>  | <b>vii</b> |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>   | <b>ix</b>  |
| <b>ÍNDICE DE QUADROS</b>   | <b>x</b>   |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>                                      | <b>xi</b>  |
| <br>   |            |
| <b>1.INTRODUÇÃO GERAL</b>  | <b>1</b>   |
| 1.1.Enquadramento do Tema  | 1          |
| 1.2. Objectivos  | 3          |
| <br>   |            |
| <b>2. OS LÍPIDOS</b>   | <b>5</b>   |
| 2.1. Propriedades Físico-Químicas e Funcionais                               | 5          |
| 2.2. A FRACÇÃO LIPÍDICA DO LEITE MATERNO                                     | 10         |
| 2.2.1. Composição  | 10         |
| 2.2.2. Importância nutricional   | 13         |
| 2.3. LÍPIDOS ESTRUTURADOS  | 15         |
| 2.3.1. Em que consistem  | 15         |
| 2.3.2. Métodos de produção   | 16         |
| 2.3.2.1. Interesterificação por via química vs via enzimática                | 17         |
| 2.3.2.2. Mecanismo de interesterificação enzimática                          | 21         |
| 2.3.2.3. Parâmetros que influenciam a actividade e a estabilidade enzimática | 25         |
| <i>Temperatura</i>   | 26         |
| <i>Produtos de oxidação dos lípidos</i>                                      | 27         |
| <i>Actividade da água</i>  | 27         |
| <i>Ácidos gordos livres</i>  | 29         |
| <i>Outros aspectos</i>   | 29         |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>  | <b>31</b> |
| 3.1. MATERIAIS .....   | 31        |
| 3.1.1. Biocatalisadores .....  | 31        |
| 3.1.2. Substratos .....  | 31        |
| 3.1.3. Reagentes e outros materiais .....  | 31        |
| 3.1.4. Equipamentos e utensílios .....   | 32        |
| 3.2. MÉTODOS .....   | 33        |
| 3.2.1. Preparação dos ómega-3 PUFA livres .....                                  | 33        |
| 3.2.2. Interesterificação enzimática .....                                       | 33        |
| 3.2.2.1. Ensaio comparativos de actividade do biocatalisador .....               | 35        |
| 3.2.2.2. Ensaio de estabilidade operacional .....                                | 35        |
| 3.2.2.3. Ensaio de modelação e optimização da interesterificação .....           | 37        |
| <i>Fundamentos da metodologia das superfícies de resposta .....</i>              | <i>37</i> |
| <i>Modo operativo .....</i>  | <i>41</i> |
| 3.2.3. Métodos analíticos .....  | 42        |
| 3.2.3.1. Determinação da actividade hidrolítica dos biocatalisadores .....       | 42        |
| 3.2.3.2. Análise dos produtos de reacção .....                                   | 43        |
| <i>Técnica de cromatografia em camada fina (TCL) .....</i>                       | <i>43</i> |
| <i>Método de metilação para obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos gordos</i> | <i>44</i> |
| .....  | 44        |
| <i>Análise dos ésteres metílicos por cromatografia gasosa capilar .....</i>      | <i>45</i> |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>49</b> |
| 4.1. Actividades de interesterificação e hidrolíticas das enzimas .....          | 49        |
| 4.2. Estabilidade operacional .....  | 52        |
| 4.4. Modelação e optimização das condições reaccionais para o biocatalisador     |           |
| seleccionado .....   | 55        |
| <b>5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>                    | <b>60</b> |
| 5.1. Conclusões gerais .....   | 60        |
| 5.2. Sugestões para trabalhos futuros .....                                      | 62        |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>63</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> – Representação de um TAG. ....   | 6  |
| <b>Figura 2</b> – Representação esquemática do mecanismo de conversão de ALA em EPA e DHA (Bryhn, 2006). ....   | 10 |
| <b>Figura 3</b> – Representação dos principais triacilgliceróis a) dos óleos vegetais e da gordura do leite de animais ruminantes e, b) da gordura do leite materno. ....   | 12 |
| <b>Figura 4</b> – Representação esquemática principal da acidólise enzimática, entre um TAG (XXX) e um ácido gordo livre (Y) (Xu, 2003). ....   | 23 |
| <b>Figura 5</b> - Esquema da reacção de acidólise enzimática entre ómega-3 PUFA e tripalmitina, utilizando uma lipase 1,3 específica ( $\omega$ -3 LC-PUFA, ácidos gordos polinsaturados ómega-3 de cadeia longa obtidos de “EPAX 1050 TG”; P, ácido palmítico - <i>adaptado de Xu et al.</i> , 2000). ....                   | 24 |
| <b>Figura 6</b> – Reactor cilíndrico de vidro de parede dupla (25 cm <sup>3</sup> ) sob agitação magnética. ....  | 34 |
| <b>Figura 7</b> – Banho termostaticado. ....  | 34 |
| <b>Figura 8</b> – “Central Composite Rotatable Design” para dois factores $X_1$ e $X_2$ . ....  | 39 |
| <b>Figura 9</b> - Exemplo de uma placa cromatográfica de sílica gel, sendo visíveis os diferentes compostos que constituem o meio reaccional. ....  | 44 |
| <b>Figura 10</b> – Montagem para metilação. ....  | 45 |
| <b>Figura 11</b> - Exemplo de um cromatograma obtido de uma amostra. ....   | 47 |
| <b>Figura 12</b> – Peak list com os cálculos efectuados em Microsoft Office Excel (áreas normalizadas, incorporação mássica e molar e, rendimento mássico e molar) do resultado do cromatograma da amostra da Fig. 11. ....   | 48 |
| <b>Figura 13</b> – Estudos de estabilidade operacional, em ensaios de reutilização em descontinuo, realizados com a “Lipozyme™ RM IM” e com a lipase/aciltransferase de <i>Candida parapsilosis</i> : A) Incorporação molar (mol%) dos ómega-3 PUFA B) Actividade residual (%), no fim de cada reutilização de 23h cada. .... | 53 |
| <b>Figura 14</b> – Superfície de resposta relativa à incorporação molar de ómega-3 PUFA na tripalmitina, em função da temperatura (°C) e da razão molar, e respectiva projecção. ....   | 57 |
| <b>Figura 15</b> - Relação entre os resultados experimentais e os preditos pelo modelo. ....  | 58 |
| <b>Figura 16</b> – Efeito da razão molar na incorporação de ómega-3 PUFA na tripalmitina, catalisada pela “Lipozyme™ RM IM”, a 70°C durante 24 horas. ....  | 59 |

## ÍNDICE DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| <b>Quadro 1</b> – Matriz central compósita rotativa (“Central Composite Rotatable Desing”) codificada para duas variáveis, $X_1$ e $X_2$ (temperatura e razão molar). .....  | 39 |
| <b>Quadro 2</b> – Matriz central compósita rotativa codificada e decodificada dos ensaios de interesterificação de tripalmitina (PPP) com omega-3 PUFA. ....   | 42 |
| <b>Quadro 3</b> – Estudos comparativos das actividades de interesterificação por acidólise enzimática de tripalmitina e ómega-3 PUFA (expresso em incorporação (%)), em ensaios de 24 horas, com as enzimas utilizadas: Actividades médias mássicas e molares (mol%); respectivos rendimentos mássicos e molares (%) e desvios padrão ( $\sigma$ ). .... | 49 |
| <b>Quadro 4</b> - Actividades hidrolíticas médias das enzimas e respectivos desvios padrão.....  | 49 |
| <b>Quadro 5</b> – Valores de incorporação molar médios obtidos após 24h de reacção catalisada pela “Lipozyme RM IM” em cada ensaio da Matriz central compósita rotativa. ....  | 55 |
| <b>Quadro 6</b> – Resultados dos efeitos lineares, e respectivos valores de $p$ , das variáveis testadas (Temperatura, T, e razão molar, RM) e sua interacção na incorporação de ómega-3 PUFA na tripalmitina pela lipase “Lipozyme™ RMIM”. ....   | 56 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Nota prévia: Nesta tese, optou-se por utilizar algumas abreviaturas utilizadas na língua inglesa, por serem as utilizadas na literatura da especialidade.

**AA** – “Arachidonic acid” – ácido araquidónico

**ALA** – “alfa-linolenic acid” – ácido alfa-linolénico

**a<sub>w</sub>** – actividade da água

**CCRD** - “Central Composite Rotatable Design” – matriz central compósita rotativa

**DAG** – “Diacylglycerols” – diacilgliceróis

**DHA** - Ácido docosa-hexenóico, C<sub>22:6</sub>

**EPA** - Ácido eicosa-pentenóico, C<sub>20:5</sub>

**EPAX 1050TG** – Concentrado de TAG enriquecido em ômega-3 PUFA (10% de EPA e 50% de DHA)

**AG** – ácidos gordos

**AGL** – ácidos gordos livres

**HMF** – “Human milk fat” – gordura do leite materno

**HMFA** – “Human Milk Fatty Acids” – ácidos gordos do leite materno

**HMFS** – “Human Milk Fat Substitutes” – substitutos da gordura do leite materno

**IQ** – “Intelligent quotient” – quociente de inteligência

**LCFA** – “Long chain fatty acids” – ácidos gordos de cadeia longa

**LC-PUFA** - “Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids” - ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa

**MAG** – “Monoacylglycerols” - monoacilgliceróis

**MCFA** – “Medium chain fatty acids” – ácidos gordos de cadeia média

**MUFA** – “Monounsaturated fatty acid” – ácidos gordos monoinsaturados

**Ómega-3 PUFA** – “Omega-3 Polynsaturated Fatty Acids” – ácidos gordos polinsaturados ómega-3

**PUFA** – “Polynsaturated fatty acids” – ácidos gordos polinsaturados

**R<sup>2</sup>** – coeficiente de determinação/ coeficiente de correlação quadrático

**R<sup>2</sup><sub>aju</sub>** – R<sup>2</sup> ajustado

**RSM** – “Response Surface Methodology” – metodologia das superfícies de resposta

**SCFA** – “Short-Chain Fatty acids” – ácidos gordos de cadeia curta

**TAG** – “Triacylglycerols” – triacilgliceróis

**CCF** – Cromatografia em camada fina.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1. Enquadramento do Tema

Tendo em conta as necessidades e exigências dos consumidores, a indústria alimentar tem procurado evoluir no fabrico de produtos de qualidade, naturais e saudáveis. Cada vez mais informados e interessados, nos últimos anos os consumidores têm revelado um crescente interesse por produtos funcionais.

Os alimentos funcionais contêm componentes fisiologicamente activos que lhes conferem benefícios para a saúde e bem-estar, para além dos efeitos nutricionais. Estes alimentos podem ser naturais e tradicionais, alimentos aos quais se adicionaram ou removeram componentes, por métodos tecnológicos ou biotecnológicos, de modo a proporcionar efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde. Para além de satisfazerem os requisitos nutricionais básicos, também previnem o tratamento de doenças (Hasler, 1998). Podem ainda ser alimentos em que a natureza e/ou a biodisponibilidade de um ou mais constituintes foram modificadas. Um alimento pode ser funcional para a população em geral ou para grupos com necessidades específicas (Howlett, 2008).

O leite materno é um alimento funcional e natural que contém 4-5% de gordura que fornece aos recém-nascidos a maior fracção de energia de que necessitam, bem como alguns nutrientes e outros componentes necessários (Xu, 2000; O'Shea *et al.*, 2005). É assim considerado o melhor alimento infantil natural, nutricional e imunológico (Megraud *et al.*, 1990). No entanto, algumas crianças não podem ser amamentadas devido a vários motivos que estão inerentes à impossibilidade por parte da mãe. Existiu assim a necessidade de encontrar uma alternativa como meio de alimentação para as crianças que não podem ser alimentadas com o leite materno. Surgem as formulações de leite para lactentes que devem satisfazer as necessidades nutricionais do rápido crescimento infantil (Forsyth, 1998) tendo, por isso, que ter a mesma composição lipídica naturalmente encontrada na gordura do leite materno (HMF, "human milk fat").

A HMF é constituída por cadeias longas de ácidos gordos, nomeadamente os ácidos oleico (30-35%), palmítico (20-30%), linoleico (7-14%) e esteárico (5,7-8%). O leite materno tem também na sua constituição pequenas quantidades de ácidos gordos polinsaturados ômega-3 (omega-3-PUFA, "polyunsaturated fatty acids"), como os ácidos eicosa-pentenóico (EPA, "Eicosapentaenoic Acid" ( $C_{20:5}$ ), 0,07-0,18%) e docosa-hexenóico (DHA, "Docosahexaenoic Acid" ( $C_{22:6}$ ), 0,26-0,41%), sendo normalmente inferior a 1% do total de ácidos gordos (Akoh, 2002; Akoh e Xu, 2002).



Ao contrário dos óleos vegetais e do leite de vaca, na HMF o ácido palmítico, o ácido gordo saturado maioritário, é principalmente esterificado na posição interna dos triacilgliceróis (TAG), enquanto os ácidos gordos insaturados são esterificados nas posições externas, *sn*-1 e *sn*-3 (Sahín *et al.*, 2005a). Assim, a utilização de óleos vegetais e de leite de vaca, como substitutos da gordura do leite materno (HMFS, “Human milk fat substitutes”) em formulações para lactentes, pode causar uma deficiência de absorção de cálcio e ácidos gordos (Innis, 1995; Xu, 2000; O’Shea, 2005). Isto deve-se à formação de sais insolúveis de cálcio com os ácidos gordos saturados (e.g. palmitato de cálcio), libertados pela actuação da lipase pancreática 1,3 selectiva durante a digestão. É por isso que, recentemente, a composição e distribuição dos ácidos gordos nos TAG das formulações para lactentes tem sido alvo de muita atenção.

Actualmente, é usado como HMFS em leites para bebés um produto comercial designado “Betapol”. Consiste em triacilgliceróis fundamentalmente do tipo OPO (ácido oleico nas posições externas, (-*sn*-1 e *sn*-3-), e o ácido palmítico na posição interna, (-*sn*-2-), do TAG) obtidos por interesterificação de óleos vegetais naturais, catalisada por uma lipase 1,3 específica. Depois da reacção, os ácidos gordos livres (AGL) que se encontram em excesso são removidos por destilação, e a tripalmitina residual é separada por cristalização.

Este produto é fabricado pela “Lipid Nutrition”, Wormerveer, na Holanda, uma filial da IOI Corporation Berhad, na Malásia (<http://www.lipidnutrition.com>, 6 Agosto de 2009).

Na área dos óleos e gorduras, a pesquisa de lipases que catalisam reacções destinadas à produção de lípidos estruturados (SL, “Structured lipids”) com propriedades funcionais específicas aumentou significativamente.

Os catalisadores inorgânicos têm sido substituídos por lipases devido aos benefícios da via enzimática relativamente aos processos químicos (Xu, 2000).

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres em meio aquoso (acilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3.). No entanto, quando presentes em meio orgânico com uma baixa actividade da água, elas também catalisam reacções de esterificação e interesterificação (Kazlauskas e Bornscheuer, 1998). As reacções catalisadas por lipases realizam-se sob condições moderadas (temperatura <70°C e pressão atmosférica) e com maior selectividade que as reacções com catalisadores inorgânicos.

A produção de TAG modificados na sua composição em ácidos gordos é efectuada através de reacções de acidólise entre um éster (um único TAG, óleo ou gordura) e um AGL. Os HMFS obtidos pela via enzimática são, para a Indústria Alimentar, dos mais importantes lípidos estruturados. Na produção de HMFS, a utilização de lipases 1,3

selectivas permite manter o ácido palmítico na posição interna dos acilgliceróis, o que é nutricionalmente desejável e não é possível por via química.

Têm sido efectuados muitos estudos com lipases imobilizadas como catalisadores, no sentido de produzir HMFS mais completos nutricionalmente e mais análogos à HMF do que o “Betapol”. Os HMFS podem ser obtidos pela reacção de acidólise entre tripalmitina ou banha (rica em ácido palmítico) e AGL de diferentes origens. Já foram obtidos HMFS contendo os ácidos: palmítico, oleico, esteárico e linoleico (Sahín *et al.*, 2005a), PUFA de cadeia longa e ácidos gordos essenciais (Mukherjee e Kiewitt, 1998; Nielsen *et al.*, 2006), como o ácido gama-linolénico (Sahín *et al.*, 2005b) e ácidos gordos polinsaturados ómega-3 (Sahín *et al.*, 2006).

A incorporação de ómega-3 PUFA nas formulações para lactentes, em particular do DHA, tem benefícios conhecidos no desenvolvimento do cérebro e do sistema nervoso das crianças. Há estudos que demonstram que os lactentes alimentados com leite materno, revelaram, durante a infância e anos mais tarde, 5-12 pontos a mais de quociente de inteligência (IQ, “Intelligent quotient”) do que os lactentes alimentados de formulações convencionais (Sahín *et al.*, 2006). Além disso, o DHA parece ser a substância do leite materno responsável pela diferença do IQ (Horrocks e Yeo, 1999).

Na Europa, Ásia e Estados Unidos são comercializadas algumas formulações para lactentes que contêm LC-PUFA, como o DHA e o ácido araquidónico (AA, “Arachidonic acid”) (Sahín *et al.*, 2006).

## 1.2. Objectivos

O objectivo principal da presente tese consistiu na produção de lípidos estruturados semelhantes à gordura do leite materno, enriquecidos em ácidos gordos polinsaturados ómega-3, através de reacções de acidólise enzimática entre tripalmitina (PPP) e um concentrado de ómega-3 PUFA, catalisadas por enzimas imobilizadas.

A maioria dos estudos de produção de lípidos estruturados são efectuados com lipases comerciais imobilizadas de custo elevado. Assim, no sentido de utilizar biocatalisadores com novas propriedades capazes de competir com estes biocatalisadores imobilizados, testou-se a lipase/aciltransferase imobilizada de *Candida parapsilosis*. Esta enzima foi produzida por sobre-expressão, do gene correspondente em *Pichia pastoris*,

conforme descrito por Brunel *et al.* (2004) e tem a particularidade de catalisar preferencialmente, em meio aquoso, alcoólise em vez de hidrólise (Briand *et al.*, 1995). Além disso, é capaz de catalisar a interesterificação de misturas de gordura que contêm ómega-3 PUFA, em meio sem solvente, em sistema descontínuo e em reactor contínuo de leite fluidizado. Quando a actividade da água ( $a_w$ ) é 0,97, apresenta uma actividade de interesterificação muito semelhante às lipases comerciais imobilizadas a valores de  $a_w$  menores que 0,5 (Osório *et al.*, 2009).

Para além desta enzima, realizaram-se ensaios comparativos de actividade de incorporação de ómega-3 PUFA, por interesterificação catalisada pelas seguintes lipases termoestáveis comerciais imobilizadas: lipase de *Rhizomucor miehei* ("Lipozyme™ RMIM"), lipase de *Thermomyces lanuginosa* ("Lipozyme™ TLIM") e de *Candida antarctica* ("Novozym™ 435").

A "Lipozyme™ RMIM" e a "Lipozyme™ TLIM" apresentam selectividade 1,3, o que permite a incorporação dos ómega-3 PUFA nestas posições específicas do glicerol, mantendo o ácido palmítico na posição *sn*-2 (Xu, 2000; Innis *et al.* 1995). A lipase "Novozym™ 435" apresenta uma especificidade que depende dos substratos onde actua. Ou seja, em algumas reacções esta enzima funciona como uma lipase não específica, enquanto noutras reacções revela uma especificidade posicional *sn*-1,3 (Novo Nordisk Biochem, 1999). Determinou-se igualmente a actividade hidrolítica das enzimas testadas, no sentido de verificar a existência de uma eventual relação entre as actividades de interesterificação e hidrólise das enzimas.

Uma vez que, do ponto de vista de implementação industrial, o biocatalisador tem de apresentar uma actividade elevada e mantê-la durante longos períodos de utilização, em reactores contínuos ou em reutilizações em reactores descontínuos, procedeu-se à avaliação da estabilidade operacional da lipase/aciltransferase imobilizada de *Candida parapsilosis*, por ser uma enzima nova nunca testada em reacções de acidólise, e da lipase comercial imobilizada 1,3 selectiva que apresentou a maior actividade de acidólise.

Foi igualmente objectivo deste estudo a modelação da reacção enzimática de acidólise catalisada pela enzima que apresentou maior actividade inicial e foi operacionalmente mais estável. Para tal, investigou-se o efeito da razão molar (PPP:ómega-3 PUFA) e da temperatura de reacção, pela metodologia das superfícies de resposta (RSM, "Response Surface Methodology").

## 2. OS LÍPIDOS

### 2.1. Propriedades Físico-Químicas e Funcionais

Os lípidos incluem os óleos, gorduras e substâncias oleosas que são insolúveis em água mas solúveis em determinados solventes orgânicos como o éter, o álcool e o hexano. (Chu *et al.*, 2002). Estes compostos são constituintes essenciais da dieta alimentar porque, para além do seu elevado valor energético (cerca de 9 kcal/g), são veículos de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e de ácidos gordos essenciais (ácido linoleico, linolénico e araquidónico) (Willis e Marangoni, 1999).

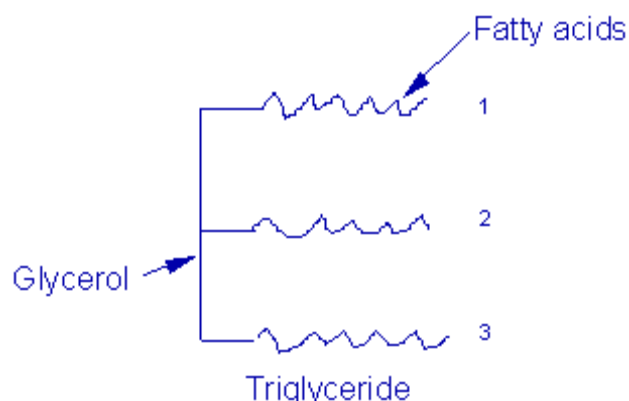
Os diferentes tipos de lípidos são muitas vezes rotulados de produtos com efeitos negativos para a saúde, pois uma elevada ingestão de gordura na dieta total encontra-se associada ao aumento do risco de doenças cardíacas, obesidade, e alguns tipos de cancro. Ainda assim, os óleos e as gorduras têm um papel vital nos produtos alimentares, não só no aspecto funcional, como sensorial (Chu *et al.*, 2002).

Muitos estudos revelam as funcionalidades desta classe de nutrientes, que podem ser usados como alimentos funcionais ou componentes de alimentos funcionais (Ferreira-Dias, 2009). Estão já comprovados os efeitos benéficos que o consumo de determinados óleos e gorduras têm no crescimento, manutenção da saúde e prevenção de doenças em crianças e adultos (Willis e Marangoni, 1999).

A nível sensorial, os consumidores são atraídos pelo *flavour*, textura, e aroma dos alimentos ricos em gordura. As gorduras interagem com outros componentes no desenvolvimento e na produção da textura e das sensações na boca, que advêm da lubrificação dos alimentos. Assim, os lípidos têm um papel importante na qualidade dos alimentos, o que não deve ser desvalorizado com a tendência de enfatizar uma dieta em gorduras, como uma dieta de nutrientes prejudiciais (Chu *et al.*, 2002)

Os óleos e as gorduras, de origem vegetal ou animal, são constituídos principalmente por TAG (cerca de 97%). Os TAG são formados a partir da esterificação de uma molécula de glicerol com três moléculas de ácidos gordos (AG) (Chu *et al.*, 2002) (Fig. 1), e são a primeira forma de ingestão dos lípidos.

Os AG (Figura 1) são um conjunto de moléculas de carbono, com comprimentos variados, com um grupo de ácido carboxílico (Guilliams, 2000).



**Figura 1** – Representação de um TAG.

O elevado número de ácidos gordos presentes em cada gordura, bem como as múltiplas combinações possíveis com as moléculas de glicerol, tornam os lípidos uma complexa mistura de compostos cuja estrutura e propriedades diferem ligeiramente.

As características físicas, a reactividade química e o comportamento fisiológico destes ácidos são determinados por factores como a natureza e a proporção de cada cadeia lipídica. Contudo, não são os únicos factores: duas gorduras que contêm, qualitativamente e quantitativamente, os mesmos ácidos gordos irão manifestar diferentes propriedades físicas, químicas e fisiológicas se os seus ácidos são distribuídos de forma diferente nos triacilgliceróis (Ucciani e Debal, 1996). A distribuição posicional dos ácidos gordos, entre as posições *sn*-1, -2 ou *sn*-3 na estrutura principal dos acilgliceróis, determina a qualidade de absorção e nutricional do óleo ou gordura.

As propriedades fisiológicas e o metabolismo dos ácidos gordos nos TAG dependem do comprimento da cadeia carbonada, posição e grau de insaturação (Osborn e Akoh, 2002).

Durante a digestão, os TAG são hidrolisados no intestino delgado pela lipase pancreática em acilgliceróis parciais, diacilgliceróis (DAG) e monoacilgliceróis (MAG), e AGL. Os MAG e os AGL são absorvidos pelos enterócitos (em células da mucosa intestinal), onde os MAG são re-esterificados na posição *sn*-2 com os AGL, de origem exógena ou endógena, para formar novos TAG.

A taxa de hidrólise do TAG pela lipase pancreática é determinada pelo comprimento da cadeia carbonada e pelo grau de insaturações dos ácidos gordos, nas posições *sn*-1 e *sn*-3. Assim, os TAG de cadeia média são mais rapidamente degradados que os TAG de cadeia longa (Sellappan e Akoh, 2001; Osborn e Akoh, 2002).

Quanto ao número de ligações duplas, os ácidos gordos dos TAG diferem de zero a seis. Relativamente ao comprimento da cadeia, geralmente de quatro a vinte e quatro átomos de carbono.

Consoante o número de ligações duplas entre os átomos de carbono nos ácidos gordos, eles são classificados em (i) ácidos gordos saturados, se não possuem ligações duplas, (ii) monoinsaturados (MUFA, "Monounsaturated fatty acids"), se possuem apenas uma ligação dupla e (iii) PUFA, se apresentam duas ou mais ligações duplas.

Os primeiros podem ser encontrados em alimentos como a manteiga, o óleo de côco e o óleo de palma. O MUFA mais comum é o ácido oleico e encontra-se em quantidades elevadas no azeite, óleo de colza pobre em ácido erúcico, óleo de amendoim e óleo de girassol. Os últimos predominam nos óleos vegetais, óleos de frutos secos e óleos de peixe (Nestel, 2000; Roche e Gibney, 2000).

Atendendo ao comprimento da cadeia, os ácidos gordos podem ser classificados em (i) ácidos gordos de cadeia curta (SCFA, "Short chain fatty acid"), que contêm dois a seis átomos de carbono (ii) ácidos gordos de cadeia média (MCFA, "Medium chain fatty acid"), i.e., com seis a doze átomos de carbono e, (iii) ácidos gordos de cadeia longa (LCFA, "Long chain fatty acid"), com 14 a 24 carbonos nas suas moléculas, quer sejam ácidos saturados ou polinsaturados (Osborn e Akoh, 2002).

Devido ao pequeno tamanho molecular, os SCFA são voláteis e solúveis em água. Consequentemente, eles são mais rapidamente absorvidos no estômago e no intestino delgado do que outros ácidos gordos, após serem hidrolisados nas posições *sn*-1 e *sn*-3, pela lipase pancreática humana. Os SCFA estão presentes principalmente na gordura do leite de vaca e têm um conteúdo calórico baixo, o que é benéfico no sentido de reduzir a obesidade (Ferreira-Dias, 2009).

Os MCFA são os principais constituintes dos óleos láuricos (óleo de palmiste e côco). Estes ácidos gordos são transportados preferencialmente pelas veias até ao fígado, onde são rapidamente metabolizados como glucose devido à sua solubilidade ser superior à dos ácidos gordos de cadeia longa. Uma vez que os MCFA não são facilmente re-esterificados num novo TAG, eles não têm tendência a acumular-se no corpo como gordura armazenada, resultando daí benefícios no controlo do peso. No entanto, a maior desvantagem do consumo de MCFA é o potencial aumento do nível de colesterol no sangue. Além disso, os MCFA não devem ser usados como a única fonte de gordura na alimentação, uma vez que eles não são AG essenciais.

Em relação aos LCFA, eles encontram-se maioritariamente nos óleos de animais marinhos e vegetais. Os LCFA são metabolizados mais lentamente que os SCFA e MCFA, e

a maior parte deles podem até perder-se nas fezes, na forma de ésteres de ácidos gordos com cálcio.

Os LCFA não podem ser directamente absorvidos ou transportados no corpo devido à sua hidrofobicidade (Osborn e Akoh, 2002). No entanto, eles formam micelas que podem entrar nas células do intestino onde são formados os quilomicrons, que são segregados no sistema linfático, e por fim, entram no sistema circulatório (Osborn e Akoh, 2002).

Entre os LCFA, os ácidos gordos polinsaturados ómega-3 e ómega-6 constituem classes especiais de ácidos gordos particularmente importantes devido às suas propriedades nutricionais, fisiológicas e físicas. Os ómega-3 PUFA, EPA (20:5<sub>n-3</sub>) e DHA (22:6<sub>n-3</sub>), têm um elevado potencial devido aos seus conhecidos benefícios na saúde humana (Nestel, 2000; Roche e Gibney, 2000).

Estes ácidos gordos essenciais têm revelado grande importância, nomeadamente, na prevenção e tratamento das doenças de coração, controlo da pressão arterial, prevenção de inflamações (Kremer *et al.*, 1990; Simopoulos, 1998; Basu *et al.*, 2006; Howlett, 2008) e, no desenvolvimento do cérebro e sistema nervoso dos bebés (Zeijdner *et al.*, 1997; Helland *et al.*, 2003; Valenzuela B., 2009).

Os benefícios cardioprotectivos dos ómega-3 PUFA são sugeridos pelo facto de populações que apresentam elevado consumo de peixe, como os japoneses e pessoas que comem frequentemente peixe, terem uma baixa taxa de mortalidade cardiovascular (Willis *et al.*, 1998). Também apresentam benefícios na prevenção de alguns tipos de cancro e no tratamento de doenças auto-imunes (ex. artrite reumatóide) (Kremer *et al.*, 1990; Weber e Leaf, 1991; Carvajal e Angulo, 1997; Zeijdner *et al.*, 1997; Simopoulos, 1998; Helland *et al.*, 2003), e conferem flexibilidade, fluidez e permeabilidade selectiva às membranas (Wagner e Graham, 2004).

Estudos recentes concluem que os ómega-3 PUFA previnem também a aterosclerose e reduzem, moderadamente, os níveis de colesterol e, significativamente, os níveis de triacilgliceróis (Nestel, 2000; Roche e Gibney, 2000).

Pode afirmar-se que os EPA e DHA são parte essencial de uma dieta saudável, sendo especialmente importantes no desenvolvimento do feto durante a gravidez e das crianças (Ruxton *et al.*, 2007).

A gravidez, a lactação e a infância são períodos específicos da vida em que os nutrientes essenciais são cruciais. Estes devem compensar o rápido crescimento e desenvolvimento dos órgãos e tecidos do feto e do recém-nascido.

Embora o lactente seja dependente de muitos nutrientes para alcançar um crescimento e desenvolvimento óptimos, nos últimos anos tem sido dada muita atenção aos ómega-3 PUFA (Bryhn, 2006). Tal como foi referido anteriormente, muitos estudos referem

que o EPA, e especialmente o DHA, têm revelado ser fisiologicamente essenciais, manifestando uma influência positiva nas funções do cérebro, tal como na saúde cardiovascular e na acuidade visual dos lactentes (Connor *et al.*, 1992; Makrides *et al.*, 1996; Carlson *et al.*, 1996, Valenzuela B., 2009). Isto deve-se à elevada proporção de DHA na massa cinzenta do cérebro (aproximadamente 3% do peso seco) e nas células fotoreceptoras da retina.

Acontece que a capacidade individual do novo ser para produzir DHA, para o próprio desenvolvimento do cérebro, é limitada. Assim, no feto e no lactente dependem respectivamente da quantidade ingerida de DHA pela mãe durante a gravidez e, depois do nascimento, na amamentação. O DHA é activamente transportado através da placenta da mãe para o feto e vai, também, entrar na constituição do leite materno.

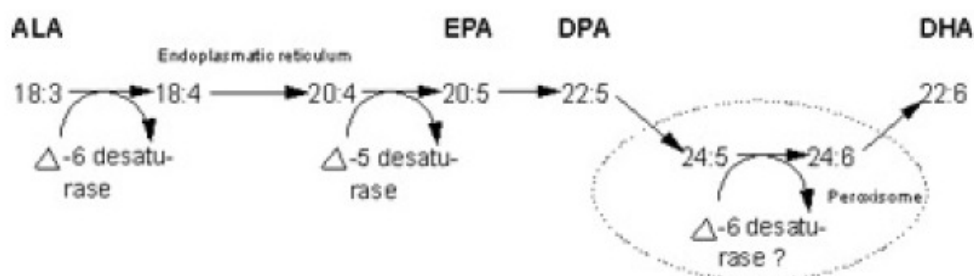
Na realidade, a presença de DHA no leite materno pode explicar por que razão os bebés amamentados têm revelado um IQ mais elevado que os bebés que são alimentados com formulações de leite sem DHA. Alguns estudos demonstraram que crianças com 4 e 5 anos cujas mães ingeriram ómega-3 PUFA durante a gravidez e no decorrer da amamentação revelaram ter maior concentração, melhor comportamento e capacidade de aprendizagem do que aqueles cujas mães não ingeriram ómega-3 PUFA (Willis *et al.*, 1998).

Os EPA e DHA são principalmente sintetizados por plantas marinhas uni- e multicelulares, como o fitoplâncton e as algas, e incorporam-se na membrana dos fosfolípidos das espécies aquáticas (Pigott e Tucker, 1987). Estes ácidos estão presentes essencialmente nos peixes designados por “gordos”, como a sardinha, o atum, a cavala, o salmão, a truta, etc. (Carvajal e Angulo, 1997). No entanto, as quantidades presentes são variáveis e devem-se a múltiplos factores: diferentes espécies de peixes, a sua localização, o tipo de gordura do peixe e o ambiente em que se encontram (Chu *et al.*, 2002).

Importa salientar que não se recomenda, especialmente a grávidas, lactentes e crianças, o consumo substancial de certos peixes devido ao facto dos seus óleos terem potencialidade para acumular contaminantes ambientais hidrofóbicos e perigosos. Assim, os benefícios saudáveis dos peixes para determinados grupos de pessoas ficam para aquém dos riscos (Ward e Singh, 2005). Contudo, para beneficiar destes ácidos gordos ómega-3 PUFA, a ingestão de peixe não é absolutamente necessária. Os suplementos em ómega-3 PUFA são uma opção para as crianças que não gostem de peixe. Além disso, sabe-se que o ácido gordo polinsaturado alfa-linolénico (ALA, “alfa-linolenic acid”), presente no óleo de linhaça, pode ser facilmente convertido em EPA e DHA (Fig. 2) (Bryhn, 2006). Já nos lactentes, a proporção de ácido alfa-linolénico convertido em EPA, por exemplo, é muito



baixa (cerca de 10%) e depende da presença de outros lípidos na alimentação (Muggli, 2008).



**Figura 2** – Representação esquemática do mecanismo de conversão de ALA em EPA e DHA (Bryhn, 2006).

O reconhecimento da importância dos ômega-3 PUFA na saúde humana levou a que algumas organizações de saúde e governamentais tomassem medidas para o estabelecimento de “ingestões adequadas” destes ácidos gordos. A Organização Europeia de Saúde recomenda um mínimo de ingestão diária de 200 mg DHA para as mulheres grávidas e que estão a amamentar. Os governos da Austrália e da Nova Zelândia estabeleceram como valores de referência de ingestão diária de 55 mg ômega-3 PUFA, para as crianças dos 4 aos 8 anos, e 70 mg, para as crianças entre os 9 e os 13 anos. De acordo com a *American Heart Association* são recomendados para os adultos saudáveis e doentes coronários os valores de ingestão diária de 300 mg e 1 g EPA/DHA, respectivamente (Muggli, 2008).

É importante referir que, para continuar a beneficiar das propriedades funcionais do DHA e EPA, a ingestão destes tem de fazer parte da nossa alimentação de forma continuada.

## 2.2. A FRACÇÃO LIPÍDICA DO LEITE MATERNO

### 2.2.1. Composição

O leite materno contém cerca de 3-5% de lípidos, entre os quais 98% são triacilgliceróis, 1% são fosfolípidos e 0,5% são esteróis. Os lípidos apresentam-se na forma

de glóbulos com uma dimensão aproximada de 4 µm de diâmetro, numa emulsão do tipo óleo em água, que é estabilizada por uma membrana (da Silva *et al.*, 2007). Apesar de esta membrana ter na sua composição essencialmente TAG (mas também MAG e DAG), ela é também constituída por proteínas (glicoproteínas), complexos lipídicos (fosfolípidos) e substâncias associadas (colesterol, vitamina A, etc.), enzimas (fosfatase alcalina, oxidase xantina, lipase, etc.) e elementos minerais (cobre, etc.) (Chambon, 1996).

Os ácidos gordos que compõem os TAG do leite materno são sintetizados pelas glândulas mamárias e reflectem a qualidade da gordura ingerida (exógena) e sintetizada (endógena), assim como a genética do indivíduo quanto à disposição para sintetizar, armazenar e utilizar os ácidos gordos. Deste modo, cada bebé amamentado tem uma ingestão de gordura única, tanto a nível quantitativo como qualitativo, que difere com o tempo de lactação, a alimentação materna, a genética da mãe, a sua cultura e país (Agostini, 2003).

Segundo Prieto *et al.*, (2003), a composição lipídica do leite materno é apenas função do comprimento e grau de insaturação dos ácidos gordos, e estes tendem a ser esterificados em diferentes fracções lipídicas.

A fracção lipídica do leite materno é composta principalmente por ácidos gordos de cadeia longa, como o ácido oleico (C18:1, que é o ácido gordo monoinsaturado predominante e representa 38% do total de ácidos gordos), seguido pelos ácidos palmítico (C16:0, 23%), linoleico (C18:2, 9%) e mirístico (C14:4, 8%). Estes quatro grandes ácidos gordos do leite materno são responsáveis por 78% do total de ácidos gordos, com os ácidos oleico e palmítico a contribuírem com mais de 75% do total (Agostini, 2003).

A gordura do leite também contém ácidos gordos de cadeia curta, como os ácidos butírico e capríco, e de cadeia média: os ácidos caprílico, cáprico e láurico (Maduko *et al.*, 2007).

Normalmente também se encontram no leite, PUFA essenciais (entre 10-13%) (Luna *et al.*, 2007), que são provenientes do tecido adiposo materno, juntamente com a gordura dietética ingerida, e estão ligados aos fosfolípidos (Prieto *et al.*, 2003), formando as camadas superficiais das membranas da gordura do leite (Jensen, 1999).

Uma vez que a composição em ácidos gordos no leite materno é variável, a quantidade de DHA e EPA também pode oscilar entre os 0,13-1,4% e os 0,05-1,10%, respectivamente. O DHA é o maior ácido gordo PUFA na fracção lipídica do leite (Luna *et al.*, 2007). Relativamente ao ácido araquidónico (AA), a sua quantidade no leite oscila entre os 0,09-0,82% (Bryhn, 2006).

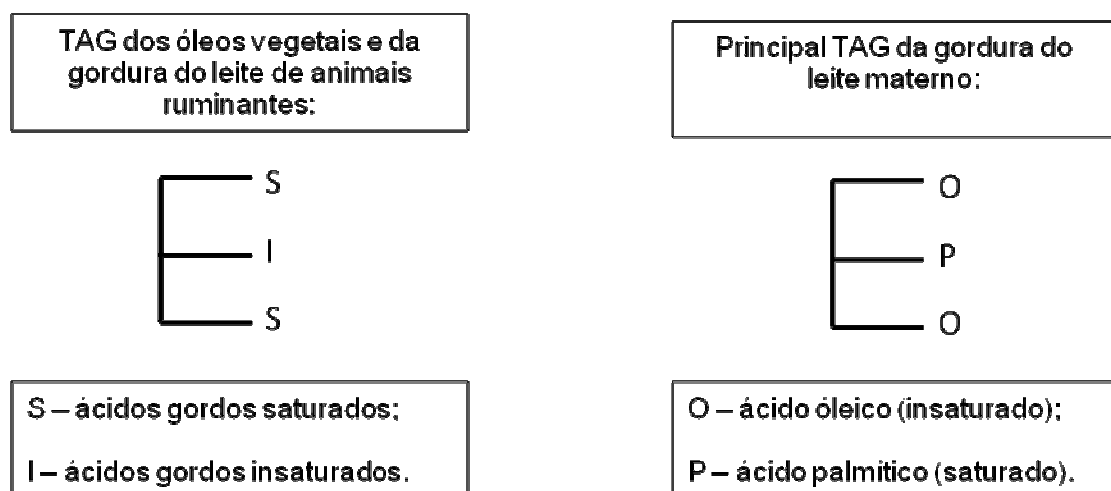
Quanto ao grau de insaturação, pode-se concluir que os TAG do leite materno são constituídos por cerca de 41% de ácidos gordos saturados, sendo predominante o ácido

palmítico. De entre os insaturados, o oleico e o linoléico estão presentes em maior quantidade (da Silva *et al.*, 2007).

Os ácidos gordos saturados são maioritariamente responsáveis pela produção de energia; não obstante, a distribuição posicional do ácido palmítico é também fundamental para maximizar a absorção de cálcio (Agostini, 2003), como será explicado adiante.

O leite materno tem uma composição rica em cálcio e energia, característica que é vital, não só para o crescimento da criança, mas também reduz significativamente a possibilidade de ocorrência de cólicas e obstipação ([www.lipidnutrition.com](http://www.lipidnutrition.com) (ref:510-1-200610)).

A estrutura principal do triacilglicerol do leite materno é muito particular: 60-70% do ácido palmítico localiza-se na posição *sn*-2 (Nielsen *et al.*, 2006) e os ácidos gordos insaturados, como o ácido oleico, são preferencialmente esterificados nas posições *sn*-1 e *sn*-3 (Jensen, 1989; Innis *et al.*, 1995; Xu, 2000). No caso das gorduras vegetais, assim como na gordura do leite dos ruminantes, o ácido palmítico (16:0) ocupa a posição *sn*-1 e *sn*-3 (menos de 20%) dos TAG ([www.lipidnutrition.com](http://www.lipidnutrition.com) (ref:510-1-200610)), sendo a posição *sn*-2 ocupada, preferencialmente, por ácidos gordos insaturados (Figura 3):



**Figura 3** – Representação dos principais triacilgliceróis a) dos óleos vegetais e da gordura do leite de animais ruminantes e, b) da gordura do leite materno.

Esta diferença estrutural tem um grande impacto na digestão, absorção e metabolismo dos nutrientes nos lactentes ([www.lipidnutrition.com](http://www.lipidnutrition.com), ref:510-1-200610).

A localização do ácido palmítico na posição *sn*-2 do TAG da gordura do leite materno aumenta a absorção dos ácidos gordos no intestino dos lactentes e diminui a perda de cálcio nas suas fezes (Quinlan *et al.*, 1995; Kennedy *et al.*, 1999). Isto deve-se à preservação do ácido palmítico na posição *sn*-2 durante a digestão, a absorção, e a biossíntese de TAG (Jensen, 1989; Innis *et al.*, 1995; Xu, 2000).

Durante a digestão do leite materno, a lipase pancreática selectiva corta nas posições *sn*-1,3 do triacilglicerol, sendo libertados os AGL principais (ácido oleico, C18) e resultando o monoglicérido 2-monopalmitina, que é rapidamente absorvido ([www.lipidnutrition.com](http://www.lipidnutrition.com) (ref:510-1-200610; Nielsen *et al.*, 2006) pela parede do intestino, entrando no sistema circulatório (Luna *et al.*, 2007).

Os AGL podem ser absorvidos ou reagir com outros compostos. A rapidez e a facilidade de absorção dependem do seu tamanho e da sua natureza, do comprimento da cadeia carbonada e do grau de insaturação. Os FA saturados de cadeia longa com (C14:0 a C22:0) não são geralmente absorvidos tão facilmente como os FA insaturados de cadeia média (C8:0 a C12:0) ([www.lipidnutrition.com](http://www.lipidnutrition.com), ref:510-1-200610).

Na maioria das gorduras vegetais e da gordura do leite de ruminantes, os seus ácidos gordos na posição *sn*-1 e *sn*-3 são os únicos que são absorvidos tal como se apresentam ([www.lipidnutrition.com](http://www.lipidnutrition.com) (ref:510-1-200610). Ainda assim, pode ocorrer a libertação do ácido palmítico do TAG pela acção das enzimas digestivas, ficando este disponível para reagir com minerais, como o cálcio, que foram ingeridos na alimentação e estão presentes no lúmen do intestino. Desta reacção resultam sabões de cálcio, como os palmitatos de cálcio, que são insolúveis e, portanto, são excretados pelo organismo do lactente. Isto leva à perda de minerais, nutrientes e energia pelo lactente, provocando também o aumento da dureza das fezes, que por sua vez origina o problema de obstipação ([www.lipidnutrition.com](http://www.lipidnutrition.com) (ref:510-1-2006102, [www.lipidnutrition.com](http://www.lipidnutrition.com) (ref:540-2-200809). Assim, quanto mais ácido palmítico existir na posição beta (*sn*-2) do TAG, tanto melhor ([www.lipidnutrition.com](http://www.lipidnutrition.com), ref:510-1-200610).

## 2.2.2. Importância nutricional

O leite materno é o único alimento energético, nutricional e imunológico que é consumido em quantidade suficiente pelos recém-nascidos (Christie, 1995), pelo menos nos primeiros meses de vida. Assim, é de grande importância a qualidade dietética dos lípidos do leite para o crescimento e desenvolvimento dos bebés (Luna *et al.*, 2007), pois a gordura

do leite materno é essencial para os componentes estruturais das membranas celulares dos recém-nascidos (Christie, 1995).

Para virem a ter boa saúde, os bebés necessitam de uma mistura de ácidos gordos saturados e insaturados na sua alimentação, e o leite materno contém a perfeita combinação de ambos ([www.lipidnutrition.com](http://www.lipidnutrition.com), ref:540-2-200809).

Como foi visto anteriormente (c.f. 2.2.1), os ácidos gordos que constituem a fracção lípida do leite são muito ricos em cálcio e energia que são essenciais, não só para o crescimento da criança, mas também para reduzir a ocorrência de cólicas e de obstipação ([www.lipidnutrition.com](http://www.lipidnutrition.com) (ref:510-1-200610). Além disso, têm um papel importante na absorção das diversas vitaminas e minerais ([www.lipidnutrition.com](http://www.lipidnutrition.com), ref:540-2-200809). O ácido palmítico (C16:0), um dos ácidos gordos saturados que se encontra em maior quantidade no leite materno, é responsável por cerca de 10% da energia fornecida ao bebé ([www.lipidnutrition.com](http://www.lipidnutrition.com), ref:540-2-200809).

Relativamente aos ácidos gordos LC-PUFA, apesar de estarem presentes na fracção lipídica do leite materno em quantidades pequenas e variáveis, os seus conhecidos benefícios (c.f. 2.1) fazem com que seja importante fornecer ao recém-nascido as quantidades adequadas. Segundo (Innis *et al.*, 2004), a produção de DHA no leite materno é fortemente influenciada pela ingestão de gordura por parte da mãe. Isto significa que a nutrição materna, em ácidos gordos, é importante para a transferência de DHA para o lactente, antes e depois do nascimento, tendo implicações nas funções neurológicas (Innis, 2008).

Os incentivos, tanto a nível da saúde como da nutrição, ao consumo elevado de ácidos gordos insaturados remontam a 1975, quando a *Food and Agriculture Organisation* (FAO) e a *World Health Organisation* (WHO) recomendam que as formulações infantis deviam assemelhar-se ao leite materno (Wagner e Graham, 2004). Desde 1990 que algumas organizações de saúde e nutrição recomendaram especialmente a inclusão de ácido araquidónico e DHA nas formulações para lactentes (Ward e Singh, 2005).

Conhecendo as propriedades nutricionais e anti-infecciosas da gordura do leite materno percebe-se que este é o primeiro alimento ideal para os recém-nascidos. Infelizmente, a amamentação nem sempre é possível, ou a mãe não pode amamentar durante um período suficientemente longo, o que constituiria a situação ideal. Assim, as formulações de leite para lactentes são uma boa alternativa para fornecer ao bebé todos os nutrientes de que necessita.

Durante muitos anos, o desenvolvimento de formulações para lactentes incidiu na produção de fórmulas que nas suas composições fossem aproximadas à da gordura do leite materno.

A maioria das fórmulas infantis disponíveis no mercado têm na sua composição fontes lipídicas de origem vegetal cuja estrutura de triacilgliceróis diferente da gordura do leite materno, o que leva a perdas na absorção de nutrientes (*c.f.* 2.2.1). Uma vez que as gorduras disponíveis na natureza não possuem a estrutura desejada, a alternativa seria a utilização de gorduras modificadas por interesterificação, como é o caso do “Betapol™” (*c.f.* 1.1).

No entanto, as formulações de leite são uma alternativa razoável para a substituição do leite materno, emulando o melhor possível a estrutura e composição dos ácidos gordos que o constituem. Contudo, as formulações actuais não têm as quantidades necessárias de DHA, o principal ácido gordo polinsaturado ómega-3 essencial.

Assim, é relevante aprofundar os conhecimentos relativamente à composição do leite materno em ácidos gordos e da sua distribuição nas cadeias dos triacilgliceróis na produção de fórmulas infantis (Gamboa e Gioielli, 2006).

O desafio consiste em incorporar nas posições *sn*-1 e *sn*-3 do triacilglicerol, ácidos gordos polinsaturados ómega-3, especialmente os ácidos EPA e DHA, por interesterificação enzimática com óleos de animais marinhos. Estes ácidos gordos não podem ser sintetizados *in vivo*. Além disso, a produção de fontes de baixo custo e de fácil obtenção é um desafio para a indústria alimentar.

Como já foi referido em 2.2.1, e segundo Jensen (1998), a distribuição estereoespecífica do ácido palmítico na posição *sn*-2 é considerada como o principal motivo para a melhor absorção das gorduras do leite materno. Desta forma, na produção de TAG enriquecidos em ómega-3 PUFA é importante garantir o ácido palmítico se mantenha na posição *sn*-2 do glicerol.

## 2.3. LÍPIDOS ESTRUTURADOS

### 2.3.1. Em que consistem

A compreensão das propriedades nutricionais e funcionais dos lípidos tem conduzido ao desenvolvimento de novas tecnologias de modificação dos óleos e gorduras, com vista a melhorar os benefícios de saúde resultantes da ingestão destes compostos (Willis *et al.*,

1998). É neste contexto que surge o interesse pela produção de lípidos estruturados (SL, “Structurated lipids”).

No caso das formulações para os lactentes, tal como já foi mencionado, é muito importante que se assemelhem o mais possível, em composição e em estrutura, à gordura do leite materno (*c.f.* 2.2.1).

Os SL são gorduras naturais com uma grande variedade de propriedades funcionais, nutricionais e organolépticas que dependem, i) da sua composição em ácidos gordos saturados e polinsaturados, ii) do comprimento da cadeia alifática dos seus ácidos e, iii) da organização da distribuição dos diferentes ácidos gordos no triacilglicerol (posição 1, 3 ou 2) (Ferreira-Dias, 2008). Consistem em TAG (i) modificados pela incorporação de novos ácidos gordos, (ii) reestruturados para mudar a posição ou perfil dos ácidos gordos, em relação ao seu estado natural ou, (iii) sintetizados (Lee e Akoh, 1998).

Estas gorduras modificadas com novas propriedades estão presentes, não só na indústria alimentar, mas também ao nível de aplicação medicinal e nutracêutica.

Os SL podem ser produzidos por via química ou enzimática, a partir de triacilgliceróis de cadeia curta, média ou longa, de gorduras vegetais ou animais. Dependendo do tipo de substrato disponível, podem ser usados os seguintes métodos de produção: (i) alcoólise; (ii) acidólise e (iii) interesterificação (Lee e Akoh, 1998).

A síntese enzimática de lípidos estruturados é normalmente catalisada por uma lipase 1,3 específica.

Os substitutos de gordura de leite materno e os TAG enriquecidos em ómega-3 são exemplos de TAG estruturados.

Outro exemplo é o desenvolvimento de SL ricos em ácidos gordos PUFA na posição *sn*-2, com os MCFA na posição *sn*-1 e *sn*-3, para pessoas com problemas digestivos. Sabe-se que a posição dos ácidos gordos nas moléculas do TAG (*sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3) podem ter um impacto significativo no metabolismo humano (Hamam e Shahidi, 2008).

### 2.3.2. Métodos de produção

A interesterificação é o termo geral utilizado para definir (i) a reacção entre um éster e um ácido (acidólise), (ii) um éster e um álcool (alcoólise), e (iii) trocas de grupos acilo entre ésteres (Xu, 2003).

Durante o processo de interesterificação por trocas de grupos acilo, a parte glicerídica das gorduras é modificada, ocorrendo um rearranjo molecular dos ácidos gordos no glicerol

(Droste, 1996), sem que, no entanto, seja modificada a sua composição. Por conseguinte, o valor nutricional das gorduras interesterificadas mantém-se inalterado, quando comparado com o das gorduras naturais que têm a mesma composição em ácidos gordos (Haumann, 1994). Além disso, a interesterificação é um método que não leva à formação de ácidos gordos na forma *trans*, o que é nutricionalmente saudável (Podmore, 1987).

A aptidão para modificar um óleo ou gordura num produto com determinadas propriedades físicas, químicas, funcionais e organolépticas tem, portanto, uma grande importância na indústria alimentar e química (Podmore, 1987; Yassin *et al.*, 2002).

### 2.3.2.1. Interesterificação por via química vs via enzimática

Como já foi referido anteriormente (c.f. 2.3.1.), as reacções de interesterificação podem ser catalisadas por via química ou por via enzimática.

As reacções químicas utilizadas na tecnologia dos óleos e gorduras estão geralmente associadas a altas temperaturas e à utilização de catalisadores inorgânicos. São reacções utilizadas principalmente para a modificação das propriedades de fusão e da taxa de plasticidade das gorduras, bem como na produção de TAG com elevado ponto de fusão (Hustedt, 1976; Konish *et al.*, 1993).

A interesterificação química inicia-se com a adição de um catalisador inorgânico à gordura (ex: metóxido de sódio, etóxido de sódio, hidróxido de sódio ou de potássio), e decorre a uma temperatura que pode variar entre os 60 e 150°C, sob pressão reduzida, e durante um período de tempo que pode ir de 30 minutos a duas horas de reacção (Erickson, 1995). O catalisador vai promover a libertação dos ácidos gordos das moléculas dos diferentes triacilgliceróis e vai ligar-se aos radicais livres que outros ácidos gordos deixaram, no mesmo ou noutra triacilglicerol constituinte dessa gordura.

Os catalisadores inorgânicos têm uma actividade elevada e são de custo reduzido; contudo, existe a possibilidade de ficarem resíduos no óleo depois da operação de interesterificação (Erickson, 1995). Têm ainda a desvantagem de reagirem com a água, havendo o risco de ocorrência de explosões. Desta forma, o óleo deve encontrar-se totalmente seco.

Devido à sua falta de especificidade, o catalisador origina produtos secundários, como sabões, monoacilgliceróis e diacilgliceróis que necessitam de ser removidos, diminuindo assim o rendimento da reacção e, aumentando os custos de purificação do produto (Erickson, 1995).



Nos últimos anos tem-se investigado a possibilidade de substituir estes catalisadores orgânicos por enzimas, para utilização na indústria alimentar, devido aos benefícios do processo enzimático relativamente aos processos químicos. Geralmente, as enzimas utilizadas no processo enzimático pertencem ao grupo das lipases.

As lipases são enzimas que derivam predominantemente de bactérias, leveduras e fungos (Macrae, 1985). São capazes de catalisar a hidrólise de ésteres, na presença de excesso de água, mas também levam a cabo reacções de síntese de ésteres (Muderhwa *et al.*, 1989; Ghosh e Bhattacharyya, 1997; Zainal e Yousoff, 1999), de acidólise (Mojović *et al.*, 1993; Fomuso e Akoh, 1997; Xu *et al.*, 1998a; Xu *et al.*, 1998b; Miura *et al.*, 1999), e de alcoólise (Macrae, 1983; Mukesh *et al.*, 1993; Graille *et al.*, 1998; Xu, 2000; Osório *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2002b), quando se encontram em meios orgânicos com baixa actividade de água ( $a_w$ ).

As lipases têm uma elevada afinidade para superfícies hidrofóbicas e são adsorvidas a interfaces entre a fase aquosa e as fases lipídicas imiscíveis.

A hidrólise e a interesterificação são reacções de multi-substratos, em que os substratos principais são os glicéridos, ácidos gordos e água. A primeira etapa da interesterificação envolve a hidrólise dos TAG, com o consumo de água, para a produção de DAG, MAG e AGL. A acumulação de produtos da hidrólise continuará durante a interesterificação até ser atingido o equilíbrio (Reyes e Hill, 1994). Para manter a actividade catalítica da reacção de interesterificação enzimática, é importante que o conteúdo em água dos óleos e gorduras seja inferior a 0,01% (m/m), e a quantidade de AGL e peróxidos seja a menor possível, preferencialmente menor que 0,05% (m/m) (Chu *et al.*, 2002).

A utilização de lipases como alternativa à via química só é possível se a enzima for imobilizada em suportes, para que estas possam ser utilizadas em processos contínuos ou reutilizadas em processos descontínuos, reduzindo desta forma os custos deste processo. Para minimizar o custo do processo, é importante aumentar o tempo de vida da enzima o mais possível.

A biotecnologia enzimática tem identificado muitas lipases de origem microbiológica com elevada actividade, boa selectividade e de estabilidade razoável (Wang e Gordon, 1991). Muitos estudos revelam que a preparação comercial imobilizada da lipase de *Rhizomucor miehei* ("Lipozyme™ RM IM") é a que revela melhores resultados em termos de actividade e estabilidade operacional (Lee e Akoh, 1996; Xu *et al.*, 1998; Soumanou *et al.*, 1998).

Ao contrário dos catalisadores inorgânicos, as lipases apresentam diferentes preferências em relação à natureza dos ácidos gordos e à sua posição nos triacilgliceróis. Esta especificidade permite separar as lipases em dois grupos: (i) as lipases não

específicas, que não apresentam especificidade em relação à posição dos ácidos gordos, actuando ao nível das três posições da molécula de acilglicerol; (ii) e as lipases com especificidade 1,3, que catalisam a libertação de ácidos gordos apenas das posições externas da molécula de triacilglicerol, originando por hidrólise ácidos gordos livres, 1,2 (2,3)- diacilgliceróis e 2-monoacilgliceróis.

Assim, quando se pretende a hidrólise completa de uma gordura ou óleo, a lipase utilizada não deve apresentar especificidade em relação à posição dos ácidos gordos nos acilgliceróis (Linfield, 1988).

As lipases não específicas têm origem, por exemplo, na *Candida rugosa*, *Geotricum candidum*, e *Staphylococcus aureus*. As lipases específicas incluem as lipases pancreáticas e enzimas provenientes de *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizomucor miehei*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus* (Chu et al., 2002). As três últimas são exemplos de lipases 1,3 específicas, tal como sucede com a proveniente de *Rhizopus delemar* (Macrae, 1983).

Têm sido identificadas poucas lipases com especificidade elevada para a posição *sn*-2, embora Riaublanc e os seus colaboradores (1993) tenham verificado que a lipase proveniente de *Candida parapsilosis* pareça possuir esta especificidade (para além da especificidade para LC-PUFA).

Apesar de terem sido estudadas um elevado número de lipases para a síntese de novos lípidos ou lípidos modificados, poucas são desenvolvidas comercialmente (Xu, 2000).

É pertinente referir que a estereoespecificidade das lipases depende não só da origem da lipase, como dos grupos acilo presentes. Também pode depender da densidade lipídica da interface, onde um aumento da concentração do substrato pode diminuir a especificidade devido ao impedimento estérico (Jaeger et al., 1994).

Na área dos óleos e gorduras comestíveis, as reacções de interesterificação através da via enzimática têm sido alvo de um interesse crescente, como uma tecnologia central para a modificação dos lípidos (Holm e Cowan, 2008).

A capacidade de actuação das lipases sob condições suaves de temperatura e pressão (temperatura inferior a 70°C e pressão atmosférica) vai permitir reduzir, consideravelmente, os efeitos poluentes e os elevados consumos energéticos associados à interesterificação química. Para além disso, e ao contrário dos catalisadores químicos, as lipases vão permitir eliminar reacções secundárias indesejáveis e, consequentemente, aumentar o rendimento e obter um produto natural com maior grau de pureza (Osório, 2008). O consumidor terá, então, a opção da escolha de um “produto natural” e de melhor qualidade, já que a utilização de enzimas é considerada como uma alternativa “natural” às actuais técnicas químicas. Outra vantagem da interesterificação enzimática relativamente à via química é que não é necessário remover os subprodutos da reacção (Mittelbach, 1990).

As lipases 1,3 selectivas são particularmente importantes e vantajosas na produção de lípidos estruturados específicos, com aplicações nutricionais, medicinais e alimentares. Além disso, com as lipases selectivas a interesterificação é mais facilmente controlada devido à elevada selectividade das enzimas para reacções específicas (Ratnayake, 1984; Yamane, 1987; Mittelbach, 1990). São, por isso, largamente utilizadas no rearranjo químico dos óleos e gorduras.

Tem sido levada a cabo investigação na área da modificação dos óleos e gorduras, através da interesterificação por lipases específicas, para a produção de formulações lácteas. Não só para obter a correcta composição em ácidos gordos, mas também a mesma distribuição posicional destes, tal como na gordura do leite materno (Karabulut *et al.*, 2007).

Tal como visto anteriormente (c.f. 2.2.1 e 2.2.2), a HMF contém, principalmente, o ácido palmítico esterificado na posição *sn*-2 do TAG. É a estrutura específica do TAG do leite materno que permite a elevada eficiência de absorção de ácidos gordos. As lipases 1,3 selectivas vão manter o ácido palmítico na posição interna dos acilgliceróis, o que é nutricionalmente desejável, e não é possível obter por catálise inorgânica.

Têm sido feitos vários trabalhos com lipases específicas. Christensen e Hølmer (1993) prepararam análogos de gordura de leite materno (HMF), através da modificação de óleo de manteiga, catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei*. Alguns processos de interesterificação por via enzimática a nível industrial estão patenteados, nomeadamente a produção enzimática de manteiga de cacau pela Unilever (Coleman e Macrae, 1977) e Fuji Oil (Matsu *et al.*, 1981). Outro exemplo, já mencionado, é a produção de triacilgliceróis a partir de óleos vegetais, com uma composição em ácidos gordos e perfil de triacilgliceróis semelhante à da gordura do leite materno, o que só se consegue através da utilização de lipases específicas 1,3 (Quinlan, 1993). Yang *et al.*, (2003) modificaram a banha, por via enzimática, para a produção de HMFS. Sahin *et al.*, (2005) produziram HMFS por reacções de acidólise, entre tripalmitina e óleo de avelã catalisada por lipases. Os HMFS podem também ser obtidos por reacções de interesterificação entre tripalmitina e misturas de óleos vegetais (Maduko *et al.*, 2007), ou banha com óleo de soja (Silva *et al.*, 2009).

Outros exemplos de aplicações de interesterificação enzimática são a produção de SL enriquecidos em ácidos gordos polinsaturados ómega-3 e 6 (Shimada *et al.*, 1996; Mu *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998; Iwasaki *et al.*, 1999; Shimada *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000; Osório *et al.*, 2001; Fomuso e Akoh, 2002; Hamam e Shahidi, 2005; Osório *et al.*, 2005, Osório *et al.*, 2006, Osório *et al.*, 2009a, Osório *et al.*, 2009b) para incorporação em margarinas, produtos de óleo de peixe modificados, manteiga de coco, e muitos outros produtos lipídicos (Jensen, 2001; Hamam e Shahidi, 2005; Nielson *et al.*, 2006).

Não obstante, a utilização de lipases na indústria alimentar, imobilizadas ou não, acarreta custos muito elevados.

Para a produção de SL devem ser tidos em consideração alguns aspectos relacionados com os sistemas reaccionais em meio orgânico, catalisados por lipases: o papel do suporte de imobilização, o solvente orgânico e as condições operacionais das reacções (Ferreira-Dias, 2008).

### 2.3.2.2. Mecanismo de interesterificação enzimática

Quando se utiliza uma lipase 1,3 selectiva como catalisador, o mecanismo de interesterificação enzimática inicia-se com a reacção entre um triacilglicerol e uma molécula de enzima, originando uma molécula de acilo-enzima e uma de 1,2 (2,3)-diacilglicerol (Semériva *et al.*, 1976). Este diacilglicerol é o intermediário chave no esquema da reacção. A formação de um triacilglicerol modificado ocorre quando um complexo acilo-enzima sofre um ataque nucleófilo por uma molécula de diacilglicerol. De forma a obter o produto desejado, o TAG deve reagir com um complexo acilo-enzima que contém o grupo acilo a incorporar no triacilglicerol (Chapus *et al.*, 1976; Semériva e Desnuelle, 1979).

O mecanismo de interesterificação enzimática catalisada por lipases (acidólise, alcoólise e trocas de ésteres) envolve a combinação da hidrólise de ésteres no TAG seguida de re-esterificação (Xu, 2000). Assim, a optimização das reacções de interesterificação resultam do balanço entre as taxas das reacções de hidrólise e esterificação.

Todos os investigadores que fizeram reacções de interesterificação com lipases verificaram que o teor de água no sistema reaccional é um factor crucial que determina a extensão da reacção de hidrólise (*c.f.2.3.2.3 Actividade da água*). Um teor de água elevado desloca o equilíbrio químico no sentido da hidrólise; um baixo teor em água desloca a reacção no sentido da interesterificação. A concentração de água no meio reaccional deve ser mantida no mínimo, no sentido de desencorajar a ocorrência da hidrólise parcial dos produtos e a formação de gliceróis, como os mono e diacilgliceróis. No entanto, o teor de água no meio reaccional deve ser suficientemente elevado para impedir a desactivação da enzima (*c.f.2.3.2.3 Actividade da água*).

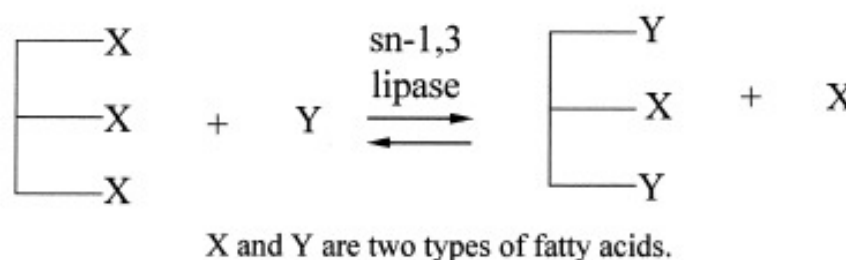
Mesmo utilizando as lipases 1,3 específicas, pode dar-se a migração de grupos acilo no processo global de produção de SL, o que desempenha um papel importante na deterioração da qualidade dos SL, devido à formação de produtos TAG indesejáveis (Kim e Akoh, 2005).

A taxa de migração de grupos acilo e a taxa de interesterificação têm demonstrado estar relacionadas a vários parâmetros. Entre estes destacam-se a temperatura de reacção, carga da lipase, suporte de imobilização da enzima, conteúdo e actividade da água, solvente e sistema reaccional (Xu *et al.*, 1998b; Sellapan e Akoh, 2001; Yang *et al.*, 2003; Xu, 2003; Camacho-Paez *et al.*, 2003; Srivastava *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2004; Kim e Akoh, 2005; Kim e Akoh, 2006). Por exemplo, numa acidólise catalisada por uma lipase comercial imobilizada de *Rhizomucor miehei* (“Lipozyme™ RM IM”), num meio sem solvente, destinada à produção de SL do tipo MLM (“Medium-Long-Medium”) e LML (“Long-Medium-Long”), a migração de grupos acilo aumenta com o tempo de reacção (Xu *et al.*, 1998a). Na produção de substitutos de gordura de leite humano (HMFS) catalisada por lipases (i) por acidólise de banha com ácidos gordos de soja (Yang *et al.*, 2003) e (ii) por interesterificação da tripalmitina com oleato de metilo (Srivastava *et al.*, 2006), a migração de grupos acilo foi favorecida com o aumento da temperatura.

Em geral, a migração de grupos acilo ocorre em menor extensão em sistemas contínuos e livres de solvente (Xu *et al.*, 1998b; Moreno *et al.*, 2004; Akoh e Kim, 2006; Lopez-Hernandez *et al.*, 2007). Em reactores contínuos, o tempo de permanência mostrou ser o factor principal para a migração de grupos acilo na posição *sn*-2. No entanto, durante produção de HMFS à “escala kg” o tempo de permanência teve pouco efeito sobre a migração de grupos acilo (Nielsen *et al.*, 2006).

A produção de triacilgliceróis modificados na sua composição em ácidos gordos tem sido habitualmente efectuada por acidólise catalisada por lipases específicas 1,3, ou por interesterificação com ésteres etílicos (também conhecido como transesterificação).

A acidólise é uma reacção em que os ácidos gordos livres são trocados pelos ácidos que se encontram no éster. A reacção, ilustrada na Figura 4, ocorre entre um triacilglicerol e ácidos gordos livres, catalisada por uma lipase *sn*-1,3 específica:



**Figura 4** – Representação esquemática principal da acidólise enzimática, entre um TAG (XXX) e um ácido gordo livre (Y) (Xu, 2003).

Esta reacção tem sido muito importante na tecnologia enzimática. No que toca à acidólise química, tem poucas aplicações devido à não especificidade posicional.

A acidólise enzimática é uma reacção reversível e ocorre, normalmente, em duas etapas: hidrólise e esterificação. Através da hidrólise e da esterificação, os novos ácidos gordos são incorporados nos triacilgliceróis do sistema, até que seja atingido o equilíbrio.

A taxa de equilíbrio é função de vários parâmetros, como a temperatura de reacção, a carga da enzima, teor de água e o sistema reaccional. Devido a inibidores da reacção, o tempo para alcançar o equilíbrio poderá ser mais longo (Xu, 2003).

O tempo de reacção deve ser o mais curto possível, uma vez que as migrações dos grupos acilo durante o processo reaccional são proporcionais ao tempo de reacção (Xu, 2003).

Têm sido desenvolvidos alguns trabalhos na produção de lípidos estruturados através de reacções de acidólise. A acidólise tem sido utilizada para a incorporação de EPA e DHA em óleos vegetais e óleos de peixe com o intuito de aumentar as suas propriedades funcionais (Huang e Akoh, 1994). Shimada *et al.* (2000) sintetizaram 1,3-araquidonol-2-palmitol-glicerol pela acidólise da estearina de palma com ácido araquidónico, usando a lipase *sn*-1,3 específica de *Rhizopus delemar*. Akimmoto e os seus colaboradores (1999), patentearam um método semelhante apara produzir HMFS ricos em ácidos gordos polinsaturados.

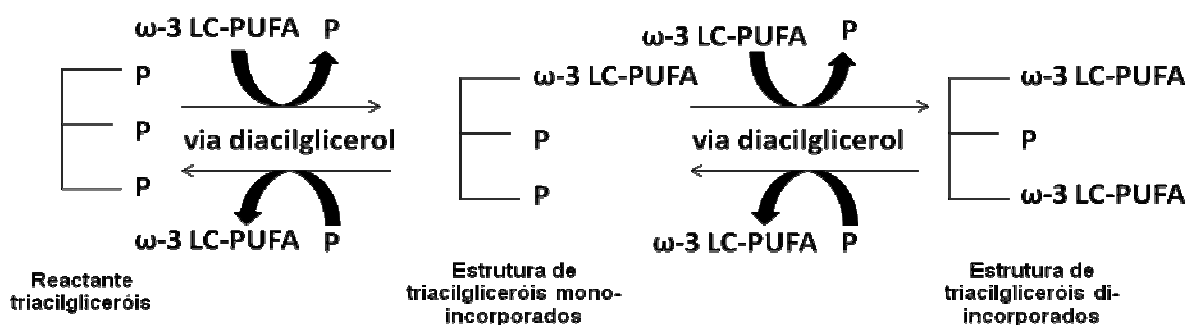
Os produtos sucedâneos de gordura do leite materno enriquecida em ómega-3 PUFA, DHA e EPA, são geralmente obtidos por acidólise, em n-hexano ou em meio livre de

solvente, entre a tripalmitina e os ácidos gordos livres, EPA e DHA, catalisada por lipases comerciais e imobilizadas 1,3 específicas.

A reacção de produção de HMFS, a partir de óleos vegetais ou animais, que melhor simula a composição em ácidos gordos e triacilgliceróis da gordura do leite materno está representada na Figura 5.

Através da acidólise também é possível enriquecer óleos com concentrações elevadas de EPA e DHA. Por exemplo, Adachi *et al.*, (1993) usaram a lipase lipoproteína 1,3 específica de *Pseudomonas* sp para enriquecer o óleo de sardinha em concentrações totais de EPA e DHA, de 29 para 44,5% (m/m).

A figura 5 representa esquematicamente a acidólise enzimática na produção de sucedâneos de gordura de leite materno enriquecidos em ómega-3 PUFA - que foi o objectivo deste trabalho:



**Figura 5** - Esquema da reacção de acidólise enzimática entre ómega-3 PUFA e tripalmitina, utilizando uma lipase 1,3 específica ( $\omega$ -3 LC-PUFA, ácidos gordos polinsaturados ómega-3 de cadeia longa obtidos de “EPAX 1050 TG”; P, ácido palmítico - *adptado de Xu et al.*, 2000).

No presente trabalho, fez-se reagir a tripalmitina com os ácidos gordos polinsaturados ómega-3 de cadeia longa, obtidos de um concentrado de TAG rico em omega-3 PUFA (“EPAX 1050 TG”, EPAX AS., Noruega). Numa primeira fase, o ómega-3 LC-PUFA foi incorporado na posição *sn*-1 do TAG tripalmitina, substituindo o ácido palmítico e daí resultando um triacilglicerol mono-incorporado, pela via diacilglicerol. Pela mesma via, um outro ómega-3 LC-PUFA vai substituir o ácido palmítico da posição *sn*-3, resultando um triacilglicerol di-incorporado, com os ómega-3 LC-PUFA a ocuparem as posições *sn*-1,3, e o ácido palmítico mantendo-se inalterado na posição *sn*-2 do TAG. A reacção pode ocorrer no sentido inverso, pela mesma via diacilglicerol.

### 2.3.2.3. Parâmetros que influenciam a actividade e a estabilidade enzimática

Presentemente, o elevado custo das lipases comerciais imobilizadas e não imobilizadas, juntamente com a baixa estabilidade operacional, têm sido reconhecidos como os maiores contratempos para o seu uso na indústria alimentar. Para tornar o processo enzimático competitivo as lipases devem ser reutilizáveis e estáveis (Ferreira-Dias, 2009).

Todas as enzimas perdem gradualmente a sua actividade. Desde que o complexo enzimático não sofra uma dramática perda de actividade (por exemplo, devido a contaminações de microrganismos produtores de proteases que vão hidrolisar as enzimas ou tratamento sob condições extremas), a perda em natureza é normalmente exponencial. A velocidade de perda desta actividade é caracterizada pelo tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), o tempo necessário para a actividade da enzima reduzir a metade do seu valor original (Rosevear *et al.*, 1987).

Existem vários factores que influenciam a actividade e a estabilidade das enzimas, nomeadamente das lipases, destacando-se a temperatura, a actividade da água ( $a_w$ ), a agitação, a pressão, a composição do meio reaccional, a presença de solventes orgânicos, de agentes oxidantes, e de compostos inibidores da actividade enzimática (e.g. produtos de oxidação lipídica, ácidos gordos livres, pigmentos e iões metálicos) (Wisdom *et al.*, 1987; Linfield, 1988; Posorske *et al.*, 1988; Wang e Gordon, 1991, Correia e Ferreira-Dias, 1998; Xu *et al.*, 1998a).

Segundo Holm e Cowan (2008), a estabilidade enzimática em meio aquoso é influenciada, principalmente, pela temperatura e pH e, em certa extensão, pela presença do substrato. Em meios não aquosos, a estabilidade enzimática manifesta-se de maneira diferente. Embora se saiba que as lipases são mais termotáveis em meios isentos de água, muitas destas determinações foram feitas em curtos períodos de tempo e não envolvem operações contínuas.

Segue-se uma breve explicação relativa a alguns dos principais factores que influenciam a actividade e estabilidade operacional das enzimas: temperatura, produtos de oxidação dos lípidos, actividade da água e ácidos gordos livres.



## Temperatura

A temperatura é um parâmetro que se deve ter em consideração sempre que se pretende aumentar a velocidade de uma reacção enzimática. A actividade catalítica das enzimas é influenciada pela temperatura, aumentando com ela, mas pode mesmo ser inibida a valores de temperatura elevados. Esta inactivação pode ser reversível ou irreversível (Martinek *et al*, 1981; Ahern e Klibanov, 1985). Segundo Rosevear *et al.* (1987), se a enzima perder actividade, nomeadamente devido à desactivação térmica, esta seguirá uma relação de Arrhenius. Nas reacções enzimáticas, verifica-se que a velocidade de reacção aumenta com a temperatura até a um valor óptimo, a partir do qual decresce.

É de salientar o efeito conjugado do aumento da velocidade de reacção e do decréscimo da estabilidade proteica com a temperatura. A actividade da enzima para uma vasta gama de temperaturas é, então, determinada pela conjugação destes efeitos. Um aumento de temperatura para valores extremos pode, pois, desnaturar completa e irreversivelmente as enzimas (Campos, 1998). O mecanismo físico que explica a inactivação enzimática pelo aumento da temperatura baseia-se num aumento da energia dos átomos, o que faz com que estes tenham maior tendência para se moverem. Se a energia for suficiente para quebrar as fracas ligações que mantêm a estrutura proteica, dá-se a desnaturação da enzima (Bailey e Ollis, 1986).

Para muitas enzimas, a desnaturação inicia-se a 40°C-50°C, acentuando-se a 55°C (Bailey e Ollis, 1986). No entanto, existem enzimas termorresistentes que só se desnaturam a temperaturas mais elevadas. Por exemplo, as preparações comerciais das lipases imobilizadas de *Thermomyces lanuginosa*, de *Rhizomucor miehei* e de *Candida antarctica*, respectivamente “Lipozyme TL IM”, “Lipozyme IM” e “Novozym 435”, produzidas pela Novozymes A/S, apresentam elevada actividade e estabilidade térmicas, tornando-as adequadas à modificação por via enzimática de gorduras na ausência de solventes orgânicos.

A inactivação térmica é um aspecto importante a ter em conta na utilização de lipases num biorreactor. A viabilidade económica do processo industrial de interesterificação enzimática vai depender do período de vida útil do biocatalisador utilizado, o que está dependente da temperatura de reacção e da resistência da enzima à termoinactivação (Bailey e Ollis, 1986). No entanto, foi sugerido que a temperatura de funcionamento de um reactor onde ocorra a reacção de interesterificação catalisada por lipases imobilizadas seja aumentada a uma taxa que compense a diminuição da actividade enzimática, permitindo

que o sistema mantenha uma actividade catalítica aproximadamente constante (Malcata *et al.*, 1990).

### ***Produtos de oxidação dos lípidos***

Os lípidos, durante o seu acondicionamento e manuseamento, estão sujeitos a reacções de oxidação, originando a formação de hidroperóxidos dos quais podem resultar produtos secundários de oxidação. Por sua vez, estes produtos podem originar *off-flavours* desagradáveis, como o ranço e outros odores que levam à sua rejeição por parte do consumidor (Frankel, 1995).

Além disso, a actividade e estabilidade das lipases decrescem na presença de produtos de oxidação, nomeadamente os hidroperóxidos (Correia e Ferreira-Dias, 1998; Xu *et al.*, 1998a). A razão desta inactivação enzimática será a polimerização da lipase devido à existência de hidroperóxidos (Xu *et al.*, 1998a).

A utilização de gorduras polinsaturadas, em que as longas cadeias de ácidos gordos polinsaturados ómega-3 são muito susceptíveis à oxidação dos lípidos, pode levar a uma diminuição da actividade e estabilidade operacional das lipases, quando utilizadas em reactores contínuos (Osório *et al.*, 2006).

O principal desafio na incorporação de TAG ricos em PUFAs, nas emulsões alimentares, é manter a estabilidade oxidativa das emulsões, de modo que as características sensoriais sejam aceitáveis, sem desenvolvimento de *off-flavour* de peixe durante a produção ou armazenamento (Ferreira-Dias, 2009).

Para evitar ou retardar a oxidação dos lípidos, usualmente recorrem-se a processos tais como a remoção do oxigénio, a utilização de um gás inerte ou a adição de antioxidantes.

### ***Actividade da água***

A água é indispensável à actividade enzimática ao participar, directa ou indirectamente, nas pontes de hidrogénio e nas forças de van der Waals, que mantêm a conformação nativa do biocatalisador (Klibanov, 1986).

Este parâmetro é muito importante porque determina a velocidade da reacção, o rendimento do produto final, a especificidade do biocatalisador, a estabilidade térmica e, possivelmente, a estabilidade operacional do biocatalisador (Yamane, 1988).

A água é necessária à acção enzimática por participar em todas as interacções não covalentes, que mantêm a conformação da enzima nativa e cataliticamente activa. Assim, a

remoção total da água de uma preparação enzimática desnatura drasticamente a conformação e inactiva a enzima. Para manter a actividade dos biocatalisadores, é essencial uma pequena quantidade de água, mesmo que em quantidades vestigiais, até porque desempenha um papel fundamental no mecanismo de catálise (Zaks e Klibanov, 1985).

A actividade da água ( $a_w$ ) é uma medida da água disponível de um sistema, e corresponde à relação entre a pressão de vapor de água desse sistema ( $P$ ) e a pressão de vapor de água pura no ar saturado à mesma temperatura ( $P_o$ ) (Parker e Birch, 1983).

As lipases actuam na interface água-substrato insolúvel (Macrae, 1985). No entanto, a água pode: (i) encontrar-se em quantidades vestigiais adsorvida às partículas de biocatalisador, verificando-se uma  $a_w$  muito baixa, o que favorece as reacções de interesterificação e de esterificação ou (ii) pode constituir uma fase separada da fase orgânica, resultando em valores de  $a_w$  elevados e favorecendo a reacção de hidrólise (Yamane, 1988).

A  $a_w$  de um sistema determina a hidratação da enzima e, assim, a sua actividade catalítica. Além disso, este parâmetro determina a posição do equilíbrio nas reacções catalisadas por enzimas hidrolíticas, como é o caso das lipases, já que a reacção de hidrólise compete com as reacções de interesterificação e de esterificação. A actividade da água influencia tanto a actividade catalítica como o rendimento da reacção em meio orgânico (Bloomer *et al.*, 1991; Valivety *et al.*, 1992). Um valor elevado de  $a_w$  pode promover uma hidrólise intensa, que resulta numa quantidade considerável de diacilgliceróis, monoacilgliceróis e de ácidos gordos livres, mas com um balanço final de triacilgliceróis baixo (taxa de interesterificação baixa). Uma  $a_w$  baixa favorece a reacção de interesterificação, pelo que proporciona um rendimento final de triacilgliceróis elevado.

Tendo em conta que o mecanismo da interesterificação catalisada por lipases envolve o processo de hidrólise dos grupos éster nos triacilgliceróis, seguido de re-esterificação (Soumanou *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2003), a optimização da reacção resulta do balanço entre as reacções de esterificação e a hidrolítica. Contudo, este processo não é fácil de controlar, já que quando se tem água em excesso no meio observa-se um deslocamento no sentido da hidrólise. No caso da presença de baixos teores de água, a reacção que se sobrepõe é a esterificação. Ujang e Vaidya (1998) sugerem que numa primeira fase, a reacção de interesterificação deve ocorrer em meios em que a actividade da água é aproximadamente 1, enquanto a segunda fase deverá decorrer a baixos valores de  $a_w$ .

Foram realizados vários estudos onde a influência da actividade da água na reacção de interesterificação foi investigada. Em geral, as lipases apresentam maior actividade na esterificação e na interesterificação dos lípidos, em meios de  $a_w$  entre 0,2 e 0,5, ou mesmo

em meios quase isentos de água ( $a_w$  de 0,064 a 0,11), dependendo do biocatalisador utilizado e da reacção (Blommer *et al.*, 1992; Parvaresh *et al.*, 1992; Svensson *et al.*, 1992; Ferreira-Dias e da Fonseca, 1995; Adlercreutz *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2004; Osório *et al.*, 2001; Petersson *et al.*, 2007). Contudo, algumas lipases apresentam o seu máximo de actividade na esterificação ou interesterificação a valores de  $a_w$  superiores a 0,5 e, em alguns casos, a valores de  $a_w$  próximos de 1, onde seria de esperar que ocorresse apenas a reacção de hidrólise (Ferreira-Dias *et al.*, 2003; Petersson *et al.*, 2007; Pires-Cabral *et al.*, 2007).

### **Ácidos gordos livres**

A hidrólise dos óleos e gorduras, tanto de origem enzimática como química, conduz ao aparecimento de ácidos gordos livres, glicerol e glicéridos parciais (mono e diacilglicéridos).

A formação de AGL leva imediatamente a uma alteração das características organolépticas do produto. Uma vez libertado um ácido gordo, a reacção de hidrólise prossegue se subsistir água no meio até que se libertem os três ácidos gordos do glicerol. Isto vai originar uma diminuição do pH do meio.

Existem estudos que referem a inactivação/inibição das lipases na presença de elevados teores de ácidos gordos livres. Nas reacções de acidólise, este aspecto limita a utilização de concentrações elevadas de ácidos gordos livres como substrato.

Uma das razões que têm limitado a aplicação prática das lipases nalguns sistemas é, pois, o efeito inibitório conferido pelos ácidos gordos livres (Dünhaupt *et al.*, 1992). Contudo, existem estudos que demonstram que os teores de ácidos gordos livres existentes nos meios reaccionais, sujeitos a interesterificação, parecem não ter qualquer efeito negativo na estabilidade da enzima (Holm e Cowan, 2008).

### **Outros aspectos**

As diferenças no comprimento da cadeia e no número de ligações duplas nas moléculas dos ómega-3 PUFA, EPA e DHA influenciam o grau de incorporação das mesmas e, por conseguinte, a actividade enzimática.

O EPA (C20:5) tem uma cadeia carbonada menor e menos ligações duplas que o DHA (C22:6). Assim, a molécula de EPA tem uma forma molecular mais simples, comparativamente com o DHA. Estas diferenças, juntamente com a especificidade das

enzimas para os diferentes ácidos gordos, conduzem à diminuição da incorporação de DHA na tripalmitina, comparativamente ao EPA (Hamam e Shahidi, 2008). Estes aspectos também podem influenciar o desempenho da actividade enzimática.

Têm sido encontrados resultados positivos de estabilidade operacional de lipases imobilizadas usadas em reutilizações ou sistemas contínuos (Shimada *et al.*, 1996, Xu *et al.*, 1998b; Yang *et al.*, 2003, Kim e Akoh, 2006, Sellapan e Akoh, 2001).

Durante a produção de TAG do tipo MLM, manteve-se 60% da actividade do biocatalisador inicial (Lipozyme™ RM IM) após quatro semanas, num reactor contínuo (Xu *et al.*, 1998b). Foi estimado um tempo de vida de 19,2 dias para o mesmo biocatalisador quando utilizado em reactor de sistema contínuo com o objectivo de produzir MLM a partir de óleo de gergelim e ácido caprílico, num sistema sem solvente (Kim e Akoh, 2006).

Também não se verificou uma redução significativa de actividade de interesterificação deste biocatalisador (i) durante quatro dias de reacção em reactor contínuo (Nielsen *et al.*, 2006) e, (ii) durante 19 ensaios contínuos de 1h de duração cada (Yang *et al.*, 2003), com o objectivo de produzir HMFS.

Quando foi utilizada a preparação comercial imobilizada da lipase de *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme™ TL IM), em meio sem solvente, para a produção de TAG ricos em ácido caprílico durante cinco ensaios repetidos de 24h cada, a incorporação deste ácido diminuiu de 18,4% (primeiro ensaio) para 8,2% (5ºensaio) (Turan *et al.*, 2006).

A possibilidade de reutilização de lipases imobilizadas em ensaios cíclicos tem sido largamente estudada. Isto deve-se, não só ao interesse na produção de misturas de gorduras modificadas na sua posição original em ácidos gordos (Zhang *et al.*, 2001), como à necessidade de diminuição do custo do processo enzimático, competindo com os actuais processos químicos (Forssell *et al.*, 1992; Posorske *et al.*, 1988; Cho *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1998b; Fonseca *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2002; Osório *et al.*, 2005; Osório *et al.*, 2006; Osório *et al.*, 2009b).

De estudos realizados, tem-se verificado que a estabilidade operacional de lipases imobilizadas depende de parâmetros como o próprio biocatalisador, a composição do meio reaccional, o teor de água da gordura e a presença de produtos de oxidação (Posorske *et al.*, 1988; Cho *et al.*, 1994, Xu *et al.*, 2002).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAIS

##### 3.1.1. Biocatalisadores

Utilizaram-se como biocatalisadores as preparações comerciais de lipases termoestáveis, imobilizadas em resinas sintéticas, gentilmente cedidas por Novozymes™, A/S, Bagsvaerd, Dinamarca: as lipases 1,3 selectivas de *Rhizomucor miehei* ("Lipozyme™ RM IM") e *Thermomyces lanuginosa* ("Lipozyme™ TL IM") e a lipase de *Candida antarctica* ("Novozym™ 435").

Foi também usada a lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, produzida por sobre-expressão do gene correspondente em *Pichia pastoris*, conforme descrito por Brunel *et al.* (2004). Esta enzima foi imobilizada em Accurel MP 1000 (Membrana GmbH, Obernburg, Alemanha) conforme descrito por Osório *et al.* (2009a). A produção, purificação e imobilização desta enzima foi realizada pelo grupo do Prof. E. Dubreucq, SupAgro, Montpellier, França.

##### 3.1.2. Substratos

Como substratos foram utilizados: tripalmitina ( $C_{51}H_{98}O_6$ ; MM 807,35 g mol<sup>-1</sup>;) com um grau de pureza em ácido palmítico (C16) de aproximadamente 95%, da Fluka e; um concentrado de triacilgliceróis enriquecidos em ômega-3 PUFA, "EPAX 1050TG", gentilmente cedido por EPAX AS, Lysaker, Noruega. Este concentrado contém cerca de 60% de ômega-3 PUFA. Destes, 10% são EPA e 50% são DHA.

##### 3.1.3. Reagentes e outros materiais

- ✓ 2',7'- diclorofluoresceína, da Fluka;
- ✓ Acetona *p.a.*, da Fisher Scientific;
- ✓ Ácido acético, da Panreac Química S.A.;
- ✓ Ácido clorídrico 36-38% (m/m), MM: 36,46 g mol<sup>-1</sup> e massa volúmica de 1,19 kg/dm<sup>3</sup>, da J.T. Baker;
- ✓ Ácido sulfúrico concentrado, da Riedel-de-Haën;
- ✓ Clorofórmio, da LAB-SCAN analytical sciences;

- ✓ Etanol 96% (v/v), da AGA;
- ✓ Éter de petróleo *p.a.*, da Panreac Química S.A.;
- ✓ Éter etílico *p.a.*, da J.T. Baker;
- ✓ Fenolftaleína;
- ✓ Hidróxido de potássio, da Merck;
- ✓ Hidróxido de sódio em palhetas (98%), da J.T. Baker;
- ✓ Meristato de metilo standard (>99%), da Fluka;
- ✓ Metanol Anidro, da J.T. Baker;
- ✓ *n*-hexano 95% (v/v), da J.T. Baker;
- ✓ Padrões de referência de trioleína, dioleína (isómeros misturados) e monoleína, de Sigma-Aldrich;
- ✓ Papel de filtro Micro Science 595, Ø125 mm, Rundfilter Filter Papel Circles, da Schleicher;
- ✓ Placas (TLC) de sílica gel 60 (0,25 mm de espessura, 20x20 cm), da Merck;
- ✓ Sulfato de sódio anidro, da Merck.

Os solventes utilizados, *n*-hexano, éter etílico, éter de petróleo e ácido acético, foram de grau de pureza *p.a.* e obtidos de diferentes fontes.

### 3.1.4. Equipamentos e utensílios

- ✓ Balança de precisão, da Kern;
- ✓ Cromatógrafo Gasoso Capilar, Finnigan TRACE GC Ultra, equipado com injetor automático AS 3000 da Thermo Electron Corporation e munido de uma coluna Trace TR-FAME com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de filme;
- ✓ Estufa de secagem, WTB Binder 7200, T<sub>máx</sub>=300°C;
- ✓ Evaporador Rotativo de Vácuo, Rotavapor R-200, da Büchi;
- ✓ Lâmpada visível nos UV (254 nm), da CAMAG;
- ✓ Micropipeta 1 mL, da Gilson;
- ✓ Placas de agitação magnética, da Variomag/Compact;
- ✓ Reactores de vidro de parede dupla, com cerca de 25 cm<sup>3</sup> de volume;
- ✓ Seringa 100 µL, da Hamilton Bonaduz;
- ✓ Tina cromatográfica de vidro, 22x20x10 cm;
- ✓ Ultrasons.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Preparação dos ómega-3 PUFA livres

A preparação dos ómega-3 PUFA livres a partir de “EPAX 1050TG” foi realizada com base no método descrito por Sahin *et al.* (2005a): saponificaram-se 25 g de “EPAX 1050TG”, misturados com 5,75 g de hidróxido de potássio, 11 mL de água destilada e 66 mL de uma solução aquosa de etanol 96% (v/v), em refluxo num balão munido de tubo condensador de refluxo, e num banho de água a 100°C, durante 60 min.

À mistura saponificada adicionaram-se 50 mL de água destilada e transferiu-se para uma ampola de decantação, onde a fase insaponificável foi extraída com *n*-hexano (2 x 100 mL) e, posteriormente, desprezada. A fase aquosa que contém o saponificado foi acidificada com uma solução de HCl 3 N, até pH 1,0.

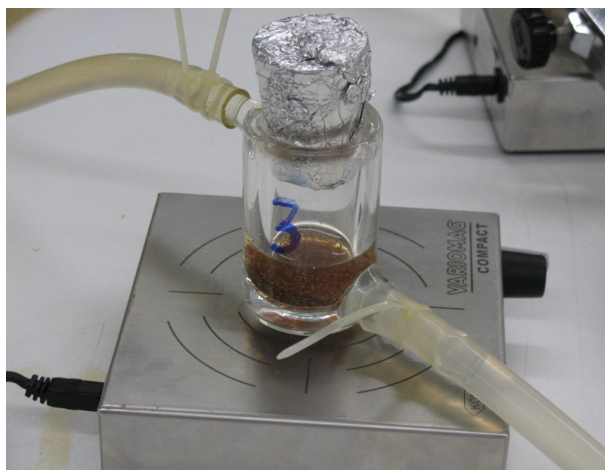
Procedeu-se à extracção dos ómega-3 PUFA livres com a adição de 50 mL de *n*-hexano. De seguida, secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro *q.b.* O sulfato de sódio anidro foi removido por filtração, com o auxílio de um papel de filtro, e a solução foi transferida para um balão de vidro cónico, de 25 mL.

O *n*-hexano foi evaporado no evaporador rotativo a 40°C e a pressão inferior a 200 mbar. No sentido de confirmar a eficiência do processo, procedeu-se à análise dos ácidos gordos livres, através da técnica de cromatografia em camada fina (*c.f.* 3.2.3.2). Os ácidos gordos obtidos foram armazenados a (-18°C) até à sua utilização, tendo sido adicionado azoto gasoso como gás inerte.

### 3.2.2. Interesterificação enzimática

Todos os ensaios de interesterificação, em descontínuo, decorreram à pressão atmosférica, em reactores cilíndricos de vidro de parede dupla (25 cm<sup>3</sup>), a 60°C e sob agitação magnética (Fig.6):





**Figura 6** – Reactor cilíndrico de vidro de parede dupla (25 cm<sup>3</sup>) sob agitação magnética.

A manutenção da temperatura foi promovida através de um circuito fechado, com a circulação de água a 60°C no interior da parede dupla do reactor. O aquecimento da água foi feito através de um banho termostaticado, como se apresenta na Fig.7:



**Figura 7** – Banho termostaticado.

O meio reaccional foi constituído por 3,90 g de tripalmitina e 3,17 g de ômega-3 PUFA, o que corresponde a uma razão molar tripalmitina:ômega-3 PUFA de 1:2, expressa em DHA (MM: 328,5 g mol<sup>-1</sup>).

Depois de a mistura estar completamente fundida, adicionou-se a enzima imobilizada a testar, na proporção de 7,7% (m/m, em relação à quantidade de tripalmitina utilizada, 3,90

g). Os reactores foram vedados com rolhas de borracha revestidas a folha de alumínio, a fim de minimizar reacções de oxidação durante o processo.

Após a reacção, o meio reaccional foi recolhido e filtrado em papel de filtro, numa estufa a 70°C, para a remoção do biocatalisador. O meio filtrado foi armazenado a (-18°C), em frascos de plástico e devidamente identificados para subseqüentes análises. Todos os ensaios foram realizados pelo menos em duplicado.

A incorporação mássica (%) e molar (%mol), de omega-3 PUFA nos TAG, conseguida com os biocatalisadores testados, foram calculadas conforme descrito (*c.f.* 3.2.3.2 - *Análise dos ésteres metílicos por cromatografia gasosa capilar*), através das equações 7 e 8, respectivamente.

O rendimento de incorporação foi calculado assumindo que os biocatalisadores testados são 1,3 específicos. Assim, 100% de rendimento corresponde a uma substituição total do ácido palmítico pelos ómega-3 PUFA, nas posições 1 e 3 dos TAG, i.e. 66,6% de grau de incorporação (Villeneuve *et al.*, 2007). Ou seja, a expressão para a determinação do rendimento, molar e mássico, pode resumir-se da seguinte forma:

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{\text{Incorporação}(\%)}{0,66} \quad (\text{Eq.1})$$

### 3.2.2.1. Ensaios comparativos de actividade do biocatalisador

Os ensaios de interesterificação por acidólise enzimática foram realizados com todas as enzimas a testar, durante 24h e nas condições previamente descritas (*c.f.* 3.2.2).

### 3.2.2.2. Ensaios de estabilidade operacional

Os ensaios de estabilidade operacional realizados com a lipase/aciltransferase imobilizada de *Candida parapsilosis* e com a lipase comercial imobilizada 1,3 selectiva que apresentou a maior actividade de acidólise consistiram em ensaios consecutivos de 23 h de duração cada, nas condições previamente descritas (*c.f.* 3.2.2).

Depois de cada ensaio, o biocatalisador foi removido do meio reaccional por filtração, em papel de filtro, numa estufa a 70°C e reutilizado num novo ensaio com meio fresco (nas

mesmas condições reaccionais). Com a lipase/aciltransferase imobilizada de *Candida parapsilosis* realizaram-se apenas sete utilizações sucessivas (161 h). Isto deveu-se ao facto de se ter verificado uma destruição e desagregação das partículas da enzima, por agitação magnética, dificultando a sua recuperação através da filtração em papel, e a sua posterior reutilização. No caso da lipase comercial imobilizada 1,3 selectiva, que apresentou a maior actividade de acidólise, realizaram-se nove ensaios, totalizando 207 horas.

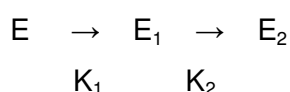
A actividade dos biocatalisadores corresponde ao grau de incorporação de ómega-3 PUFA na tripalmitina, observados no fim de cada ensaio,  $n$ .

O primeiro ensaio foi usado como referência (100% de actividade). A actividade residual ( $a_n$ , %) dos biocatalisadores, no fim de cada ensaio  $n$  ( $n=1, \dots, 10$ ), foi estimada a partir dos modelos ajustados aos ensaios de estabilidade operacional, pela expressão que se segue:

$$a_n = \left( \frac{\text{Incorporação}_{\text{ensaio } n}}{\text{Incorporação}_{\text{ensaio } 1}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

A estes ensaios testaram-se modelos de inactivação linear e de inactivação em série de Sadana (1980). Devido à complexidade da molécula de enzima, a taxa de desactivação enzimática nem sempre é constante. Existe a possibilidade do coeficiente de desactivação enzimática do modelo de primeira ordem aumentar ou diminuir com o tempo (Sadana, 1980).

Nestas situações, os resultados experimentais são por vezes bem representados pelos modelos de desactivação em série (Sadana, 1980):



onde  $K_1$  e  $K_2$  são constantes de desactivação de primeira ordem e  $E$ ,  $E_1$  e  $E_2$  representam diferentes estados conformacionais da enzima. Designado por  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  a razão das actividades específicas  $E_1/E$  e  $E_2/E$ , se  $\alpha_2=0$  então no estado final a enzima encontra-se desactivada.

A velocidade de desactivação dos estados  $E$  e  $E_1$  pode ser dada por:

$$-dE/dt = K_1 E \quad (\text{Eq. 3})$$

$$-dE_1/dt = K_2 E_1 - K_1 E \quad (\text{Eq. 4})$$

Sendo  $E_0$  a actividade inicial. Designando por  $a$ , a fracção remanescente dessa actividade, obtém-se:

$$a = [E + E_1] / E_0 \quad (\text{Eq. 5})$$

Sadana (1980) mostrou que,

$$a = [K_2 \exp (-K_1 t) - K_1 \exp (-K_2 t)] / [K_2 - K_1] \quad (\text{Eq. 6})$$

e ainda que,

$$a \approx 1 - \frac{1}{2} K_1 K_2 t^2 \quad (\text{Eq. 7})$$

quando  $K_1 t$  e  $K_2 t \ll 1$ .

O tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) dos biocatalisadores foi estimado a partir das respectivas equações das actividades residuais, obtidas pelos modelos ajustados aos dados experimentais obtidos.

Relativamente ao modelo de Sadana (1980), considerando  $K_1 K_2 = K_d$ , onde  $K_d$  é o coeficiente de desactivação, a eq. 8 permite estimar o tempo operacional de meia vida da preparação enzimática:

$$t_{1/2} = (1/K_d)^{1/2} \quad (\text{Eq. 8})$$

O ajuste dos modelos foi realizado através da ferramenta “solver” do Microsoft Office Excel, do Windows, versão 8.0 SR2, com o objectivo de minimizar a soma dos quadrados dos resíduos, entre os pontos experimentais e os estimados pelo respectivo modelo. Este procedimento foi desencadeado através das seguintes opções: método Newton, interações 100, precisão de  $10^{-5}$ , 5% de tolerância e 0,001 de convergência.

### 3.2.2.3. Ensaio de modelação e optimização da interesterificação

#### *Fundamentos da metodologia das superfícies de resposta*

A Metodologia das superfícies de resposta (“Response Surface Methodology”, RSM) é uma combinação de métodos matemáticos e estatísticos que são usados para determinar os

efeitos de diferentes variáveis e modelar e otimizar os processos nos quais a resposta é afectada pelas diferentes variáveis, por si só ou combinadas (Myers e Montgomery, 2002). Pretende-se assim encontrar combinações de um conjunto experimental de factores que levarão a uma resposta óptima (Lumor e Akoh, 2005).

A RSM tem sido extremamente utilizada na optimização de reacções de produção de SL por muitos investigadores (Shieh *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1998a, 1999 e 2000; Osório *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2005; Osório *et al.*, 2009a). Um dos motivos deve-se ao facto de não existirem modelos teóricos capazes de prever, completamente, para um sistema complexo, os efeitos das características da enzima, transferências de massa e calor, factores de estabilidade, da termodinâmica da água, etc. Outra razão prende-se com estes factores terem uma interacção simultânea, o que influencia uma resposta desejada (Xu, 2003).

Com a utilização da RSM no delineamento experimental, os resultados estatisticamente aceitáveis podem ser obtidos através da redução do número de experiências e, deste modo, proporcionar economias de custo e de tempo (Myers e Montgomery, 2002; Montgomery, 1997), bem como melhorar a qualidade dos produtos nas aplicações industriais.

Uma optimização satisfatória obtida pela RSM pode fornecer muita informação válida para a aplicação no sistema. A optimização pode originar um modelo matemático entre respostas e factores, podendo ser avaliado o principal efeito de cada factor na resposta (Xu, 2003).

Através da metodologia das superfícies de resposta obtêm-se equações polinomiais em função das variáveis definidas como significativas na resposta, que correspondem graficamente a superfícies denominadas por superfícies de resposta.

Quando são utilizados modelos factoriais, a modelação das condições reaccionais é efectuada pelos polinómios de primeira ordem e, portanto, descritos por uma superfície plana (Osório *et al.*, 2001). Quando a estas matrizes se adicionam pontos centrais e/ou pontos estrela, é possível avaliar a curvatura da superfície de resposta e ajustar modelos não lineares aos resultados experimentais.

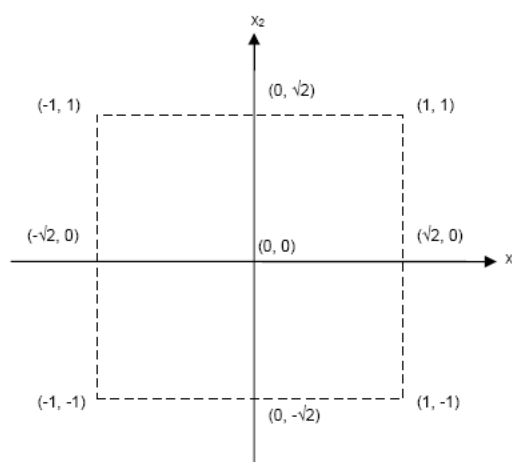
A matriz central compósita rotativa (“Central Composite Rotatable Design”, CCRD) é uma das mais utilizadas na RSM (Montgomery, 1997).

Neste estudo, os ensaios de modelação e optimização da interesterificação foram realizados de acordo com uma CCRD, tal como a apresentada no Quadro 1:

**Quadro 1** – Matriz central compósita rotativa (“Central Composite Rotatable Design”) codificada para duas variáveis,  $X_1$  e  $X_2$  (temperatura e razão molar).

| Ensaio | $X_1$     | $X_2$     |  |
|--------|-----------|-----------|--|
| 1      | -1        | -1        | <b>Matriz Factorial</b><br><b>2k</b>                         |
| 2      | 1         | -1        |  |
| 3      | -1        | 1         |  |
| 4      | 1         | 1         |  |
| 5      | $-\alpha$ | 0         | <b>Pontos Estrela</b><br><b><math>\alpha=\sqrt{2}</math></b> |
| 6      | $\alpha$  | 0         |  |
| 7      | 0         | $-\alpha$ |  |
| 8      | 0         | $\alpha$  |  |
| 9      | 0         | 0         | <b>Repetições do</b><br><b>ponto central</b>                 |
| 10     | 0         | 0         |  |
| 11     | 0         | 0         |  |

A CCRD é constituída por uma matriz factorial, por um conjunto de pontos estrela e um conjunto de repetições do ponto central. A matriz factorial  $2k$  ( $k$  é o número de variáveis) corresponde aos pontos extremos, que são os pontos que vão definir a zona de interesse. Estes pontos são os vértices de um cubo cujo centro é a origem  $(0, 0)$ , e os extremos inferior e superior são  $(-1, 1)$  (Montgomery, 1991) (Figura 8):



**Figura 8** – “Central Composite Rotatable Design” para dois factores  $X_1$  e  $X_2$ .

Os pontos exteriores à matriz factorial, mas dentro do domínio experimental, representados por  $(-\alpha, \alpha)$ , são os pontos estrela. Cada variável tem dois pontos estrela, que estão situados nos eixos de referência, a uma distância de  $2^{k/4}$ . Estes pontos permitem testar a aplicabilidade do modelo (Montgomery, 1991). No caso de duas variáveis,  $\alpha = \sqrt{2}$ .

Os pontos estrela vão diminuir a influência dos pontos centrais no resultado final, além de diminuir o erro que a região de interesse possa trazer, caso esta tenha sido mal definida.

O ponto central (0, 0), situado na origem dos eixos, permite estimar a variância do erro experimental, que se considera constante ao longo de todo o domínio experimental. Deverão existir várias repetições deste ponto central (Montgomery, 1991).

Para a elaboração de um delineamento experimental eficaz devem ser feitos estudos preliminares, que permitam: (i) identificar as variáveis que actuam no processo, (ii) identificar correctamente a região de interesse no espaço em que o processo actua, (iii) determinar o ponto central e, (iv) definir os níveis em que os factores que influenciam o processo irão variar.

As equações polinomiais que se obtêm através deste método, traduzem a resposta,  $Y$ , em função das variáveis de decisão,  $X_i$ , dando origem a uma superfície de resposta com  $(k+1)$  dimensão, sendo  $k$  o número de variáveis  $X_i$ .

O estimador de Superfície de Resposta, para duas variáveis é dado por:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad (\text{Eq. 9})$$

Em que:

**Y**- variável dependente;

**$X_1X_2$**  - variáveis independentes;

**$b_1, b_2$**  – coeficientes lineares;

**$b_{11}, b_{22}$**  – coeficientes quadráticos;

**$b_{12}$**  – coeficiente linear de interacção  $X_1X_2$ .

O ponto óptimo da resposta equivale ao cálculo dos extremos da função polinomial, (máximo ou mínimo). Para se calcularem os valores, máximos ou mínimos, das variáveis  $X_1$  e  $X_2$ , calculam-se as suas respectivas derivadas parciais.

O ajuste do modelo aos resultados experimentais é traduzido pelo coeficiente de determinação  $R^2$ , sendo  $R$ , o coeficiente de correlação entre as variáveis independentes.

A partir do valor de  $R^2$  pode calcular-se o coeficiente de determinação ajustado,  $R^2_{aju}$ , pela seguinte equação (Wiesberg, 1985):

$$R^2_{aju} = 1 - [(n-1)/(n-k)] \times (1 - R^2) \quad (\text{Eq.10})$$

O  $R^2_{aju}$  deve ser sempre apresentado em conjunto com o  $R^2$  quando se estuda a aplicabilidade do modelo. O  $R^2$  e o  $R^2_{ajustado}$  variam entre 0 e 1 e, quanto mais próximo estiver da unidade, mais o modelo se ajusta à realidade. O  $R^2_{aju}$  é sempre inferior ao  $R^2$ .

Os valores preditos pelo modelo devem ser confrontados com os valores observados experimentalmente. Estes últimos devem ser expressos graficamente e a sua informação deve ser complementada com os valores de  $R^2$  e  $R^2_{aju}$ .

### **Modo operativo**

O biocatalisador que revelou ser mais estável, após sucessivas reutilizações, foi submetido a ensaios de modelação e optimização da interesterificação.

Para a compreensão das interações e efeitos na reacção de duas variáveis, os ensaios realizaram-se nas condições semelhantes às descritas em 3.2.2, aplicando a RSM. De acordo com a CCRD utilizada fez-se variar a temperatura da reacção, entre os 58°C e 72°C, e a razão molar tripalmitina/ômega-3 PUFA (expresso em moles de DHA) entre 1:2 e 1:4.

A quantidade de biocatalisador utilizada foi constante e igual a 7,7% (m/m, em relação à quantidade de tripalmitina utilizada, 3,90 g), assumindo que os ômega-3 PUFA têm uma densidade aproximada à do ácido oleico ( $C'_{18}$ ), igual a 0,89.

Realizaram-se 11 ensaios, cada um com duração de 24 horas, nas condições apresentadas no quadro seguinte:



**Quadro 2** – Matriz central compósita rotativa codificada e decodificada dos ensaios de interesterificação de tripalmitina (PPP) com omega-3 PUFA.

| Ensaio | Matriz codificada |             | Matriz decodificada |                                |  |
|--------|-------------------|-------------|---------------------|--------------------------------|--|
|        | T (°C)            | Razão Molar | T (°C)              | Razão Molar (PPP:omega-3 PUFA) |  |
| 1      | -1                | -1          | 60                  | 1:2,3                          | <b>Matriz Factorial</b><br><b>2<sup>k</sup></b>              |
| 2      | -1                | 1           | 60                  | 1:3,7                          |  |
| 3      | 1                 | -1          | 70                  | 1:2,3                          |  |
| 4      | 1                 | 1           | 70                  | 1:3,7                          |  |
| 5      | -1,41             | 0,00        | 58                  | 1:3,0                          | <b>Pontos Estrela</b><br><b><math>\alpha=\sqrt{2}</math></b> |
| 6      | 1,41              | 0,00        | 72                  | 1:3,0                          |  |
| 7      | 0                 | -1,41       | 65                  | 1:2,0                          |  |
| 8      | 0                 | 1,41        | 65                  | 1:4,0                          |  |
| 9 (C)  | 0                 | 0           | 65                  | 1:3                            | <b>Repetições</b><br><b>do ponto central</b>                 |
| 10 (C) | 0                 | 0           | 65                  | 1:3                            |  |
| 11 (C) | 0                 | 0           | 65                  | 1:3                            |  |

As incorporações molares médias do biocatalisador seleccionado, nas condições seleccionadas de acordo com a CCRD, foram determinadas conforme descrito em 3.2.3.3 - *Análise dos ésteres metílicos por cromatografia gasosa capilar*, de acordo com a eq.14.

Realizaram-se ainda ensaios complementares, a 70°C, utilizando as seguintes razões molares: 1:5, 1:7 e 1:9.

### 3.2.3. Métodos analíticos

#### 3.2.3.1. Determinação da actividade hidrolítica dos biocatalisadores

As actividades hidrolíticas das enzimas foram determinadas através da realização de hidrólise dos TAG, através da seguinte técnica: adicionou-se 1 mL do concentrado de ómega-3 PUFA “EPAX TG1050” a 10 mL de água destilada, num balão de Erlenmeyer que foi submetido a agitação por ultra-sons, durante 10 minutos.

De seguida, a esta emulsão foi adicionada  $0,1 \text{ g} \pm 0,0001$  de enzima, tendo sido posteriormente colocada em reactores, durante 5 minutos, a 60°C e sob agitação magnética

vigorosa. Após cinco minutos, juntou-se 25 mL de uma solução de acetona-etanol 96% (1:1, v:v), previamente preparada, de modo a parar a reacção. Os ácidos gordos livres (AGL) foram titulados com uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0,1 N, até ao aparecimento da cor carmim ténue, tendo sido utilizado como indicador a fenolftaleína. Registou-se o volume do titulante gasto.

Procedeu-se de igual forma para todos os biocatalisadores em estudo, em triplicados. Determinou-se, também em triplicado, a actividade hidrolítica de um ensaio em branco, i.e, sem a adição do biocatalisador.

Define-se uma *unidade* de actividade hidrolítica (U) como a quantidade de lipase (grama) capaz de libertar uma micromole de ácidos gordos (neste caso, de DHA) por minuto, nas condições descritas (Senanayake e Shahidi, 2002). Assim, a actividade hidrolítica (AH) das enzimas é dada pela expressão que se segue:

$$AH = \frac{DHA}{t \times m} \quad (\text{Eq.11})$$

Sendo:

**DHA** – o número total de µmol de DHA libertados;

**t** – tempo em que decorreu a reacção, expresso em minuto;

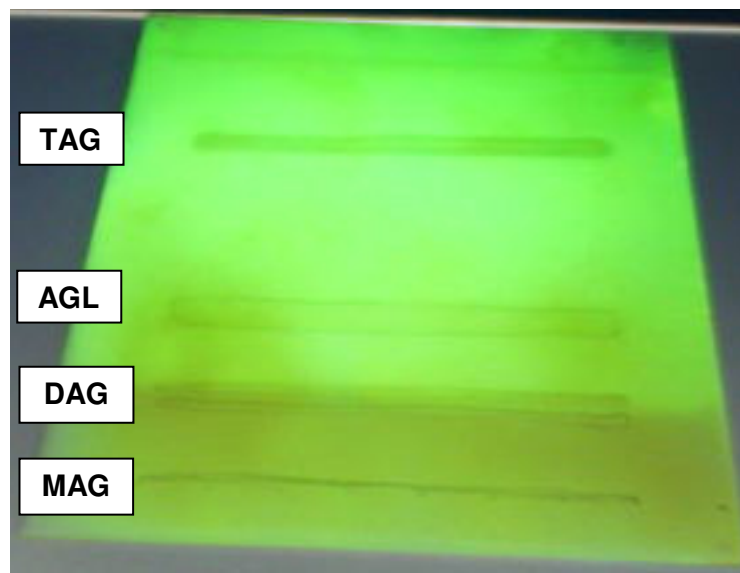
**m** – massa de enzima utilizada para a determinação, expressa em grama. Neste caso foi sempre constante e igual a 0,1 g ± 0,0001.

### 3.2.3.2. Análise dos produtos de reacção

#### *Técnica de cromatografia em camada fina (TCL)*

Para determinar a quantidade de ómega-3 PUFA incorporado nos triacilgliceróis, seguiu-se o seguinte procedimento para cada amostra: dissolveu-se 0,1500 g ± 0,009 de meio reaccional em 25 mL de clorofórmio *p.a.* Foram depositados 200 µL desta solução em banda contínua na placa de TLC de sílica gel. A eluição ocorreu num banho de *n*-hexano, éter etílico e ácido acético na proporção de 70:30:1,5 (v/v/v), respectivamente. As placas foram pulverizadas com 0,2% (m/v) de uma solução reveladora alcoólica de 2':7' – diclorofluoresceína em 95% (v/v) de etanol e observadas à luz ultravioleta a 254 nm. Foram

identificados os vários grupos de compostos (triacilgliceróis, ácidos gordos livres, diacilgliceróis e monoacilgliceróis) (Fig. 9), por comparação com padrões de referência.



**Figura 9** - Exemplo de uma placa cromatográfica de sílica gel, sendo visíveis os diferentes compostos que constituem o meio reaccional.

### ***Método de metilação para obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos gordos***

No sentido de obter os ésteres metílicos dos ácidos gordos, para posterior análise por Cromatografia Gasosa, raspou-se a banda dos TAG com o auxílio de uma espátula e metilou-se segundo o método descrito no *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* de 1991, N<sup>o</sup> L248/44. Para se proceder à metilação, a sílica gel que continha os TAG foi misturada com 5 mL de reagente de metilação (metanol anidro/*n*-hexano/ácido sulfúrico concentrado; 75/25/1, v/v/v), num balão de Erlenmeyer esmerilado que foi, posteriormente, adaptado a um tubo condensador de refluxo (Fig.10):



**Figura 10** – Montagem para metilação.

Na preparação do reagente de metilação o ácido sulfúrico foi sempre adicionado no fim, pois esta é uma reacção de tipo exotérmico.

A mistura esteve em ebulição sob refluxo, durante 60 min, num banho de água a cerca de 80°C. De seguida, adicionou-se à mistura 10 mL de água destilada e 10 mL de éter de petróleo e transferiu-se para uma ampola de decantação. Agitou-se vigorosamente o conteúdo para permitir a separação das fases na decantação. Recuperou-se a camada superior – fase orgânica, lavou-se duas vezes com água destilada (2 x 10 mL) e secou-se com sulfato de sódio anidro. O sulfato de sódio anidro foi removido por filtração em papel e a solução foi transferida para um balão cónico de 25 mL para evaporação do solvente no evaporador rotativo, a 30°C e pressão inferior a 200 mbar.

### ***Análise dos ésteres metílicos por cromatografia gasosa capilar***

O resíduo seco obtido pela evaporação do solvente, no evaporador rotativo, foi dissolvido em 100 µL de uma solução de 0,1% (v/v) de miristato de metilo (padrão interno) em *n*-hexano, e 1 µL desta solução foi analisada no Cromatógrafo Gasoso.

As análises foram efectuadas num Cromatógrafo Gasoso do modelo Finnigan TRACE GC Ultra gas chromatograph (Thermo Electron Corporation), munido de uma coluna capilar

Thermo TR-FAME (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm filme), um injetor automático AS 3000 da Thermo Electron Corporation (a operar em modo *splitless*) e um detector de ionização por chama. As temperaturas do injetor e do detector mantiveram-se nos 250°C e 260°C, respectivamente. Utilizou-se o hélio como gás de arraste a um caudal de 1,5 mL/min. O ar e o hidrogénio foram fornecidos ao detector a caudais de 350 mL/min e 35 mL/min, respectivamente.

Para a análise das amostras o programa das temperaturas foi ajustado da seguinte forma: 60°C durante 1 min; aumento de temperatura até 150°C a 15°C/min; manutenção 150°C por 1 min; aumento para 220°C a uma taxa de 5°C/min; e um patamar final a 220°C durante 10 min.

Da análise das diferentes amostras obtiveram-se os respectivos cromatogramas e *peak lists*, com os tempos de retenção (min) dos compostos presentes nas amostras e as áreas dos picos (Figs.11 e 12).

Através das áreas dos picos (%) calculou-se a percentagem molar (expressa em %mol) e a mássica de incorporação de ômega-3 PUFA, e respectivos rendimentos. Para tal, começou-se por normalizar as áreas a partir da área do padrão interno (miristato de metilo), através da seguinte expressão:

$$\text{ÁreasNormalizadas}(\%) = \frac{A_{\text{picos}}(\%)}{A_{\text{padrão int.}}(\%)} \quad (\text{Eq.12})$$

À soma das áreas normalizadas dos picos considerados, foram descontadas as áreas normalizadas do ácido palmítico (AP) e dos ácidos gordos presentes na amostra inicial,  $t=0$  ( $AG_{t=0}$ ). Com base nisto, a incorporação mássica é calculada da seguinte forma:

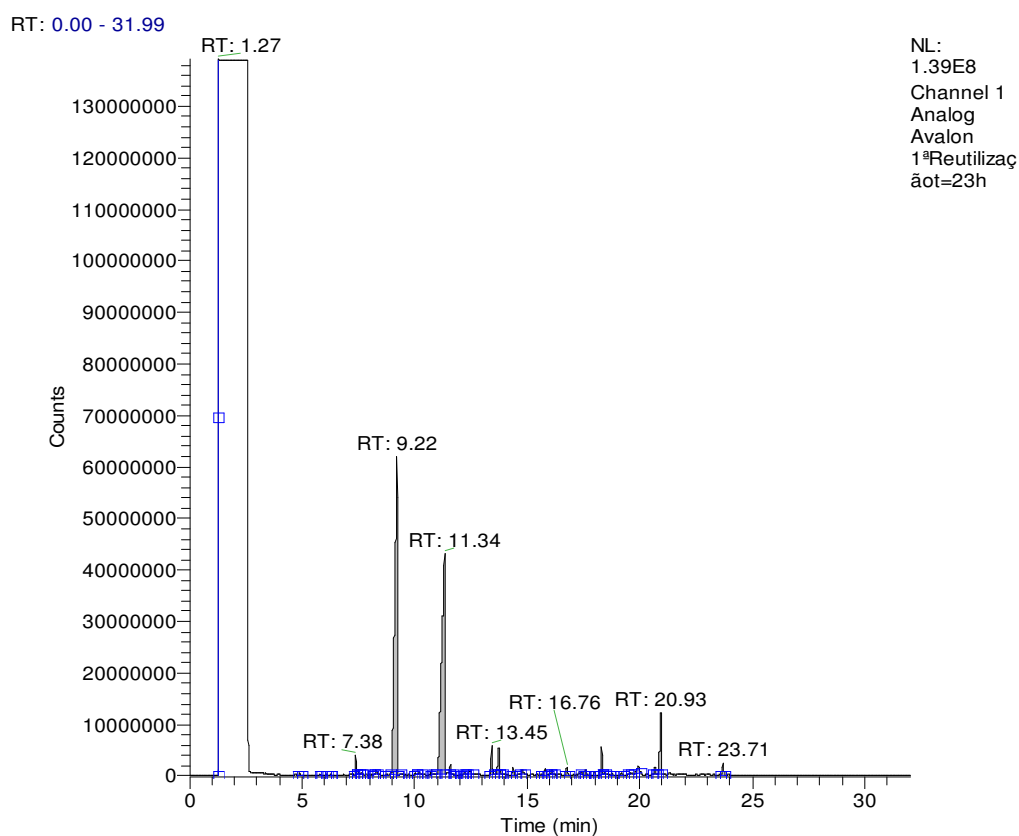
$$\text{Inc.mássica}(\%) = \frac{\text{Total}}{\text{Total} - (AP + AG_{t=0})} \times 100 \quad (\text{Eq.13})$$

Admitiu-se que todos os ácidos gordos incorporados nos TAG, após interesterificação ( $\text{Total} - (AP + AG_{t=0})$ ), são DHA. Então, para a determinação da incorporação molar (%mol) utilizou-se a seguinte expressão:

$$\text{Inc.molarDHA}(\% \text{mol}) = \left( \frac{\frac{\text{Inc.mássicaDHA}(\%)}{\text{MMDHA}(\text{g} / \text{mol})}}{\left( \left( \frac{\text{Inc.mássicaDHA}(\%)}{\text{MMDHA}(\text{g} / \text{mol})} \right) + \left( \frac{100 - \text{Inc.mássicaDHA}(\%)}{\text{MM}(\text{AP})(\text{g} / \text{mol})} \right) \right)} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.14})$$

As massas molares (MM) do DHA e do ácido palmítico (AP) são,  $328,5 \text{ g mol}^{-1}$  e  $256,4 \text{ g mol}^{-1}$ , respectivamente.

O rendimento, mássico e molar (%) foi calculado como descrito anteriormente (*c.f.* 3.2.2).



**Figura 11-** Exemplo de um cromatograma obtido de uma amostra.

| PEAK LIST                    |          |        |          |       |          |         |
|------------------------------|----------|--------|----------|-------|----------|---------|
| 1ªReutilização=23h.raw       |          |        |          |       |          |         |
| RT: 0.00 - 31.99             |          |        |          |       |          |         |
| Number of detected peaks: 44 |          |        |          |       |          |         |
| Apex RT                      | Start RT | End RT | Area     | %Area | Height   | %Height |
| 1,27                         | 1,26     | 1,29   | 1,64E+08 | 13,34 | 1,17E+08 | 42,22   |
| 4,89                         | 4,82     | 4,97   | 1661905  | 0,14  | 395638,1 | 0,14    |
| 5,8                          | 5,76     | 5,84   | 291970,5 | 0,02  | 120684,5 | 0,04    |
| 6,08                         | 6,03     | 6,14   | 919128,7 | 0,07  | 291059,5 | 0,1     |
| 6,28                         | 6,22     | 6,33   | 913800   | 0,07  | 274002,5 | 0,1     |
| 7,38                         | 7,32     | 7,45   | 8140872  | 0,66  | 3746357  | 1,35    |
| 7,49                         | 7,45     | 7,56   | 1557096  | 0,13  | 577754,8 | 0,21    |
| 7,64                         | 7,61     | 7,71   | 1038575  | 0,08  | 302621,8 | 0,11    |
| 8,16                         | 8,13     | 8,22   | 349976,8 | 0,03  | 148376,9 | 0,05    |
| 8,27                         | 8,22     | 8,36   | 2786602  | 0,23  | 926606,7 | 0,33    |
| 8,75                         | 8,7      | 8,8    | 655208   | 0,05  | 223628,5 | 0,08    |
| 9,22                         | 8,91     | 9,29   | 4,49E+08 | 36,63 | 61771353 | 22,27   |
| 9,36                         | 9,29     | 9,39   | 332596   | 0,03  | 120241,3 | 0,04    |
| 10,03                        | 9,97     | 10,08  | 1015996  | 0,08  | 386613   | 0,14    |
| 10,21                        | 10,14    | 10,28  | 1382056  | 0,11  | 323266,8 | 0,12    |
| 10,74                        | 10,69    | 10,83  | 2921769  | 0,24  | 899175,4 | 0,32    |
| 11,34                        | 10,96    | 11,35  | 4,03E+08 | 32,87 | 42889753 | 15,46   |
| 11,6                         | 11,53    | 11,65  | 5293697  | 0,43  | 1786380  | 0,64    |
| 11,79                        | 11,75    | 11,84  | 402659,5 | 0,03  | 161393,8 | 0,06    |
| 12,06                        | 12,01    | 12,1   | 377713   | 0,03  | 165189,1 | 0,06    |
| 12,23                        | 12,18    | 12,29  | 1045392  | 0,09  | 306472   | 0,11    |
| 12,45                        | 12,35    | 12,57  | 4348510  | 0,35  | 614977,2 | 0,22    |
| 13,45                        | 13,32    | 13,51  | 21145131 | 1,72  | 5553592  | 2       |
| 13,73                        | 13,62    | 13,79  | 22004139 | 1,79  | 5175948  | 1,87    |
| 13,82                        | 13,79    | 13,89  | 2393724  | 0,2   | 747774,2 | 0,27    |
| 14,36                        | 14,28    | 14,47  | 5432325  | 0,44  | 1413228  | 0,51    |
| 14,78                        | 14,71    | 14,91  | 4108889  | 0,33  | 827539,8 | 0,3     |
| 15,65                        | 15,6     | 15,71  | 474330   | 0,04  | 163853   | 0,06    |
| 15,79                        | 15,71    | 15,9   | 4966710  | 0,4   | 1197548  | 0,43    |
| 16,01                        | 15,95    | 16,03  | 741840,1 | 0,06  | 262281,9 | 0,09    |
| 16,11                        | 16,03    | 16,18  | 4208556  | 0,34  | 969279,9 | 0,35    |
| 16,76                        | 16,68    | 16,86  | 5412272  | 0,44  | 1429982  | 0,52    |
| 17,42                        | 17,37    | 17,5   | 2335443  | 0,19  | 679760,1 | 0,25    |
| 17,61                        | 17,54    | 17,71  | 3888322  | 0,32  | 1051317  | 0,38    |
| 18                           | 17,94    | 18,06  | 1100421  | 0,09  | 337301,9 | 0,12    |
| 18,31                        | 18,2     | 18,36  | 17075988 | 1,39  | 5409800  | 1,95    |
| 18,42                        | 18,36    | 18,49  | 1795365  | 0,15  | 462868,2 | 0,17    |
| 18,75                        | 18,7     | 18,82  | 1262018  | 0,1   | 442947,4 | 0,16    |
| 19,2                         | 19,13    | 19,27  | 1263701  | 0,1   | 350362,6 | 0,13    |
| 19,55                        | 19,49    | 19,59  | 1012521  | 0,08  | 326521   | 0,12    |
| 19,92                        | 19,75    | 20,05  | 11689299 | 0,95  | 1398175  | 0,5     |
| 20,67                        | 20,58    | 20,73  | 4715511  | 0,38  | 1392766  | 0,5     |
| 20,93                        | 20,78    | 20,98  | 48772032 | 3,97  | 12013703 | 4,33    |
| 23,71                        | 23,6     | 23,8   | 9335367  | 0,76  | 2197905  | 0,79    |
| Total:                       |          |        |          |       |          | 1,311   |
| Total - ácido palm.          |          |        |          |       |          | 0,414   |
| Total - (ác. palm. + AG t=0) |          |        |          |       |          | 0,298   |
| Incorp. Mássica (%)          |          |        |          |       |          | 22,689  |
| Rend. Mássico (%)            |          |        |          |       |          | 34,068  |
| Incorp. Molar (%mol)         |          |        |          |       |          | 18,638  |
| Rend. Molar (%mol)           |          |        |          |       |          | 27,984  |

**Figura 12** – Peak list com os cálculos efectuados em Microsoft Office Excel (áreas normalizadas, incorporação mássica e molar e, rendimento mássico e molar) do resultado do cromatograma da amostra da Fig. 11.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Actividades de interesterificação e hidrolíticas das enzimas

Determinaram-se para as enzimas em estudo os graus de incorporação de ômega-3 PUFA na tripalmitina, assim como as suas actividades hidrolíticas.

Os graus de incorporação mássica e molar (%) e os respectivos rendimentos estão apresentados no Quadro 3. As actividades hidrolíticas médias encontram-se no Quadro 4.

**Quadro 3** – Estudos comparativos das actividades de interesterificação por acidólise enzimática de tripalmitina e ômega-3 PUFA (expresso em incorporação (%)), em ensaios de 24 horas, com as enzimas utilizadas: Actividades médias mássicas e molares (mol%); respectivos rendimentos mássicos e molares (%) e desvios padrão ( $\sigma$ ).

| Biocatalisador         | Incorporação |          |              |          | Rendimento  |          |              |          |
|------------------------|--------------|----------|--------------|----------|-------------|----------|--------------|----------|
|                        | Mássica (%)  | $\sigma$ | Molar (mol%) | $\sigma$ | Mássico (%) | $\sigma$ | Molar (mol%) | $\sigma$ |
| “Lipozyme™ RMIM”       | 25,2         | 1,52     | 20,8         | 1,33     | 37,9        | 2,29     | 31,3         | 2,00     |
| “Lipozyme™ TLIM”       | 10,2         | 0,70     | 8,2          | 0,57     | 15,4        | 0,96     | 12,3         | 0,86     |
| “Novozym™ 435”         | 26,1         | 1,83     | 21,6         | 1,60     | 39,2        | 2,74     | 32,8         | 2,43     |
| Lipase/aciltransferase | 10,6         | 2,79     | 8,5          | 2,26     | 15,9        | 4,18     | 12,8         | 3,39     |

**Quadro 4** - Actividades hidrolíticas médias das enzimas e respectivos desvios padrão.



| Biocatalisador         | Actividade hidrolítica<br>média (U/mg) | Desvio padrão ( $\sigma$ ) |
|------------------------|--|----------------------------|
| “Lipozyme™ RMIM”       | 0,20                                   | 0,01                       |
| “Lipozyme™ TLIM”       | 3,16                                   | 0,06                       |
| “Novozym™ 435”         | 2057,3                                 | 99,9                       |
| Lipase/aciltransferase | 0,30                                   | 0,00                       |

Analizando o Quadro 3, verifica-se que os maiores níveis de incorporação de ômega-3 PUFA na tripalmitina, após 24 h de reacção nas condições apresentadas anteriormente, ocorreram para a “Novozym™ 435” (Inc. Mássica: 26,1%, Inc.Molar: 21,6 mol%) e “Lipozyme™ RM IM” (Inc. Mássica: 25,2%, Inc.Molar: 20,8mol%), seguida pela lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis* (Inc. Mássica: 10,6%, Inc.Molar: 8,5mol%) e “Lipozyme™ TL IM” (Inc. Mássica: 10,2%, Inc.Molar: 8,2 mol%).

No entanto, em estudos anteriores a “Lipozyme™ TL IM” mostrou adequar-se como biocatalisador na interesterificação de misturas de estearina de palma, óleo de palma e concentrados de triacilgliceróis ricos em ômega-3 PUFA (“EPAX 2050TG”, rico em DHA, e “EPAX 4510TG”, rico em EPA), em meios livres de solvente (Nascimento *et al.*, 2004; Osório *et al.*, 2006).

Relativamente à lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, não parece apresentar grande actividade para a incorporação de ômega-3 PUFA na tripalmitina, nas condições realizadas neste estudo. Estes resultados contrariam a afinidade desta enzima para misturas enriquecidas em ômega-3 PUFA, verificada em estudos anteriores como o de Osório *et al.*, (2009). Uma vez que a carga de lipase/aciltransferase no suporte é de apenas 1% (Osório *et al.*, 2009a), pensa-se conseguir aumentar a actividade do biocatalisador mediante um aumento da carga.

O relevante grau de incorporação obtido neste estudo pela lipase comercial imobilizada de *Candida antarctica* (“Novozym™ 435”) coincide com o bom desempenho constatado por Osório *et al.* (2001) na interesterificação de estearina de palma com um concentrado de triacilgliceróis enriquecidos em ômega-3 PUFA e óleo de soja, em meio livre de solvente.

A “Lipozyme™ RMIM” parece ser o biocatalisador mais adequado à produção de HMFS por acidólise entre tripalmitina e ômega-3 PUFA num sistema reaccional sem solvente, uma vez que apresenta selectividade 1,3. A “Novozym™ 435” pode não apresentar especificidade 1,3 para este sistema, apesar de apresentar melhores níveis de

incorporação que a “Lipozyme™ RMIM”. Teríamos que avaliar a sua selectividade 1,3 para decidir se esta seria a enzima mais adequada à produção de HMFS. A determinação da composição em ácidos gordos em posição *sn*-2 não foi realizada neste trabalho, por falta de tempo. Posteriormente, procedeu-se à avaliação da selectividade 1,3 dos biocatalisadores utilizados neste estudo, na acidólise de tripalmitina com ácido oleico em meio sem solvente. Verificou-se que, quando se utilizou Novozym 435 como catalisador, o ácido oleico ocupava 33,22 mol-% da posição-2, enquanto com a Lipozyme TL IM e com a Lipozyme RMIM, os graus de incorporação eram de 20,6 e 16,0 mol-%, respectivamente. Curiosamente, com a lipase-aciltransferase de *C. parapsilosis*, verificou-se uma migração de apenas 6,6 mol-%, contrariando os resultados de Riaublanc e os seus colaboradores (1993) (Tecelão *et al.*, submetido).

Através da comparação dos resultados dos Quadro 3 e 4, pode constatar-se que não existe qualquer relação entre a actividade hidrolítica e a de interesterificação das enzimas testadas.

É interessante observar que a “Lipozyme™ TL IM”, a segunda enzima com maior actividade hidrolítica (3,16 U/mg), foi a que revelou menores graus de incorporação de ómega-3 PUFA.

É de assinalar que a “Lipozyme™ TL IM” apresentou uma actividade hidrolítica 10,5 vezes superior à da lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, apesar de revelar valores de actividade de interesterificação muito semelhantes. Verifica-se a relação inversa entre a lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis* e a “Lipozyme™ RM IM”: ambas têm actividades de hidrólise muito próximas, 0,30 e 0,20, respectivamente, mas com a “Lipozyme™ RM IM” foi incorporado cerca de 2,5 vezes mais ómega-3 PUFA do que com a lipase-aciltransferase.

Quanto à “Novozym™ 435”, esta foi a enzima que apresentou maior actividade hidrolítica (2057,3 U/mg), distanciando-se consideravelmente das restantes. Verifica-se uma grande discrepância nos valores das actividades hidrolíticas, especialmente entre a “Novozym™435” e a “Lipozyme™ RM IM”. No entanto, as actividades de interesterificação das mesmas são muito semelhantes.

Deste modo, a lipase termostável “Novozym™435” foi a mais coerente na relação entre a actividade hidrolítica e de interesterificação, revelando uma elevada actividade hidrolítica e apresentando-se o melhor biocatalisador a interesterificar neste sistema.

Com estes resultados pode afirmar-se que a actividade hidrolítica destas enzimas hidrolisarem não está relacionada com a sua actividade de interesterificação nas condições anteriormente descritas.

## 4.2. Estabilidade operacional

Apesar da actividade de interesterificação da lipase-aciltransferase não ser elevada, optou-se por avaliar a sua estabilidade operacional uma vez que se trata de uma enzima nova que nunca tinha sido testada em sistemas semelhantes. Os resultados dos estudos de estabilidade operacional, nos ensaios de reutilização em descontínuo, realizados para as enzimas imobilizadas “Lipozyme™ RM IM” e lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, em termos de incorporação molar de cada ensaio (A) e de actividade residual (B), encontram-se representados na Figura 13.

Através da Figura 13, pode observar-se que o maior grau de incorporação ocorreu, como seria de esperar, com a lipase “Lipozyme™ RM IM”, verificando-se uma perda linear da actividade ao longo dos novos ensaios em utilizações sucessivas.

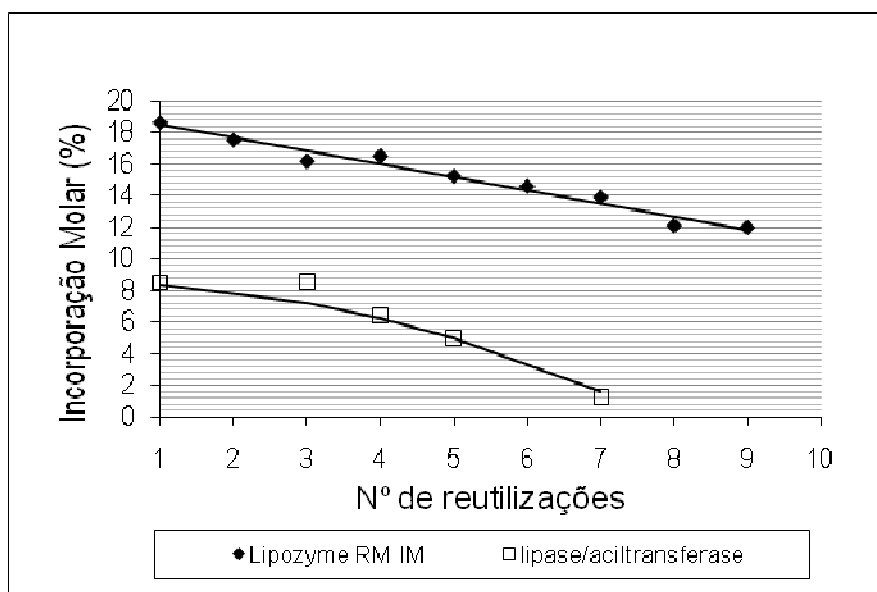
Por analogia com os modelos ajustados à desactivação do biocatalisador, em biorreactores contínuos, a equação linear seguinte pode ser aplicada à actividade residual ( $a_n$ ) da lipase “Lipozyme™ RM IM” no fim de cada ensaio consecutivo,  $n$ :

$$a_n = -4,439n + 103,63 \quad (\text{Eq.15})$$

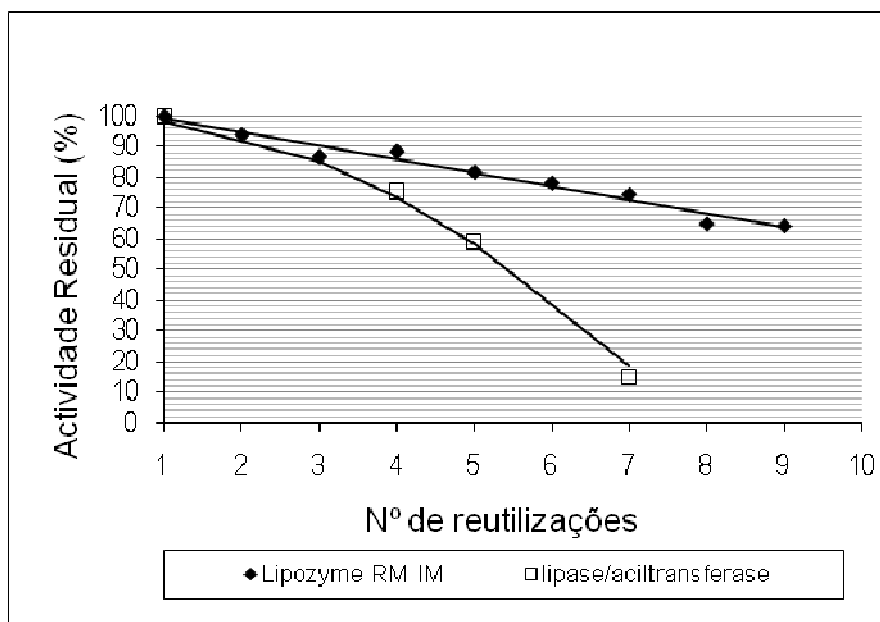
$$(R^2=0,9696)$$

Assim, o tempo de meia vida estimado para a lipase “Lipozyme™ RM IM” ocorre ao fim de 12,1 ensaios, o que corresponde a 278, 30 horas. Esta diminuição de actividade pode dever-se à presença de hidroperóxidos, também relatada por Wang e Gordon (1991), Xu *et al.* (1998a) e Osório *et al.* (2006). Foi verificado, em estudos anteriores, o efeito negativo da presença de produtos de oxidação, fosfolípidos, clorofilas e carotenóides e polímeros lipídicos na estabilidade desta lipase (Correia e Ferreira-Dias, 1998; Xu *et al.*, 1998a). No entanto, não se verificou uma redução significativa na actividade de interesterificação deste biocatalisador (i) durante 4 dias em reactor contínuo (Nielsen *et al.*, 2006) nem (ii) durante 19 ensaios consecutivos de 1 h cada (Yang *et al.*, 2003), na produção de HMFS.

A)



B)



**Figura 13** – Estudos de estabilidade operacional, em ensaios de reutilização em descontinuo, realizados com a “Lipozyme™ RM IM” e com a lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*: A) Incorporação molar (mol%) dos ômega-3 PUFA B) Actividade residual (%), no fim de cada reutilização de 23h cada.

Relativamente à lipase/aciltransferase imobilizada de *Candida parapsilosis*, observa-se um decréscimo da actividade durante os ensaios sucessivos de 23 h, cada. Este comportamento pode ser descrito pelo modelo cinético de inactivação em série proposto por

Sadana (1980) (Eq.7), em que a actividade residual original (%) da lipase/aciltransferase,  $a_n$ , ao fim de cada ensaio  $n$ , pode ser dada por:

$$a_n = 100 - 50k_d n^2 \quad (\text{Eq. 16})$$

onde  $k_d$  é o coeficiente de desactivação. Então, o modelo de desactivação da lipase/aciltransferase, ajustado aos dados experimentais, é dado pela equação seguinte, com  $k_d$  igual a 0,0332  $n^{(-2)}$ :

$$a_n = 100 - 1,66n^2 \quad (\text{Eq. 17})$$

Através da eq.17, estimou-se que, ao fim de 5,5 ensaios (126,2 h), a actividade da lipase/aciltransferase imobilizada de *Candida parapsilosis* se reduziu para metade da sua actividade inicial.

Em estudos recentes de interesterificação de misturas de estearina de palma, óleo de palma e concentrados de TAG ricos em ómega-3 PUFA, catalisada por este biocatalisador em reactor contínuo (Osório *et al.*, 2009b), foi estimado um tempo de meia vida de apenas 9h. Este biocatalisador foi também reutilizado em ensaios sucessivos de 23 h, num total de 4 ensaios, quer (i) utilizando meio fresco sem a adição de água, quer (ii) com adição de água para re-hidratar o biocatalisador. Nestas condições, obtiveram-se tempos de meia vida de 10 h e 18 h, respectivamente sem adição e com adição de água ao meio reaccional. Assim, a perda de actividade pode ser explicada fundamentalmente pela progressiva desidratação da enzima durante a reacção, e não por efeitos de inibição pelo produto ou pelo substrato (Osório *et al.*, 2009b).

No presente estudo, o tempo de meia-vida foi cerca de 7 vezes superior ao melhor resultado obtido por Osório *et al.* (2009b). Provavelmente, a presença de produtos de oxidação nas gorduras utilizadas na formulação dos meios reaccionais, por Osório *et al.* (2009b), possa explicar a menor estabilidade operacional desta enzima nesse sistema.

#### 4.4. Modelação e optimização das condições reaccionais para o biocatalisador seleccionado

Os resultados obtidos nos ensaios de modelação e optimização das condições reaccionais para a lipase “Lipozyme™ RM IM”, segundo uma matriz compósita rotativa (c.f.3.2.2.3 – *Modo operativo*) (Quadro 2), foram analisados através do programa *Statistica TM*, da Stasoft, versão 5, USA.

Procurou-se perceber se as variáveis em estudo, razão molar e temperatura, têm efeitos significativos na incorporação de ômega-3 PUFA na tripalmitina, pela lipase “Lipozyme™ RM IM”.

O Quadro 5 apresenta os graus de incorporação molar médios obtidos para cada ensaio.

**Quadro 5** – Valores de incorporação molar médios obtidos após 24h de reacção catalisada pela “Lipozyme RM IM” em cada ensaio da Matriz central compósita rotativa.

| Ensaio | Matriz codificada |             | Matriz decodificada |             | Incorporação molar média (mol%) |
|--------|-------------------|-------------|---------------------|-------------|---------------------------------|
|        | T (°C)            | Razão Molar | T (°C)              | Razão Molar |                                 |
| 1      | -1                | -1          | 60                  | 2,3         | 16,1                            |
| 2      | -1                | 1           | 60                  | 3,7         | 26,4                            |
| 3      | 1                 | -1          | 70                  | 2,3         | 15,1                            |
| 4      | 1                 | 1           | 70                  | 3,7         | 30,9                            |
| 5      | -1,41             | 0           | 58                  | 3,0         | 19,3                            |
| 6      | 1,41              | 0           | 72                  | 3,0         | 45,5                            |
| 7      | 0                 | -1,41       | 65                  | 2,0         | 23,1                            |
| 8      | 0                 | 1,41        | 65                  | 4,0         | 15,1                            |
| 9 (C)  | 0                 | 0           | 65                  | 3           | 21,7                            |
| 10 (C) | 0                 | 0           | 65                  | 3           | 23,1                            |

A partir da matriz apresentada (Quadro 5) não foi possível ajustar um modelo aos dados experimentais. Ou seja, as variáveis razão molar e temperatura (°C) não revelaram ter efeitos significativos na incorporação dos ômega-3 PUFA na tripalmitina, resultando valores de  $R^2$  e  $R^2_{\text{ajustado}}$  muito baixos, 0,55 e 0,10, respectivamente.

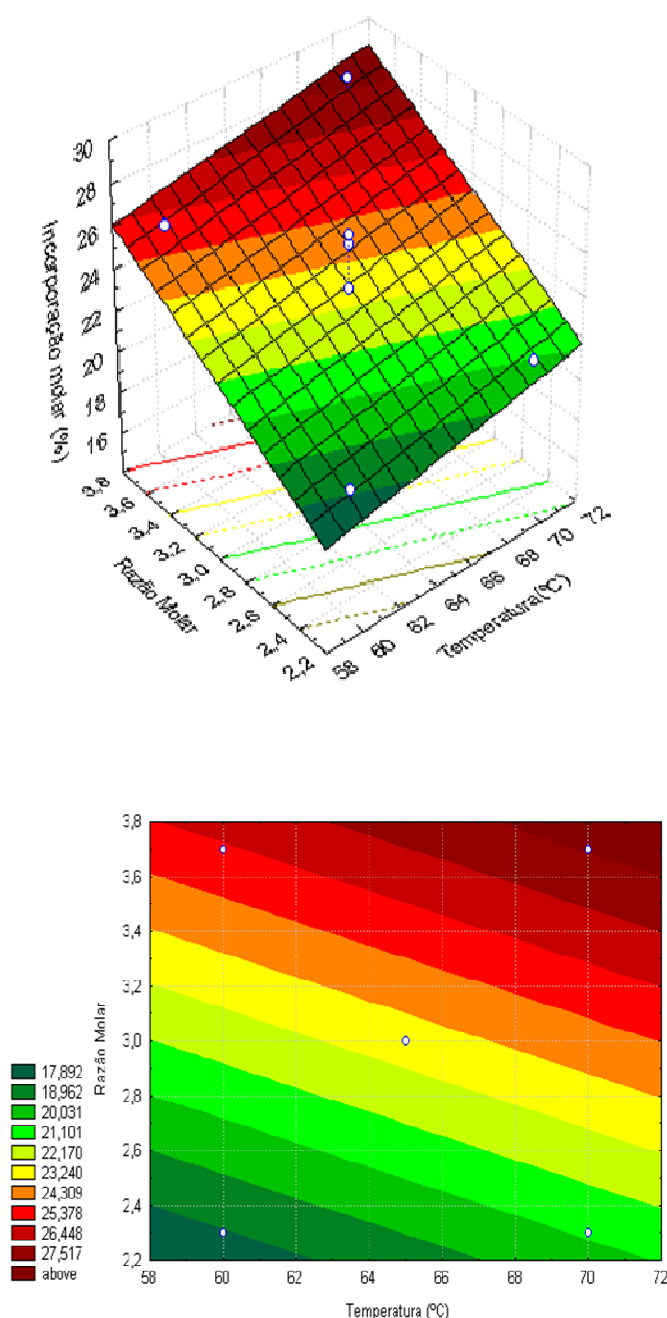
Estes resultados podem dever-se ao facto de as condições de reacção dos pontos estrela serem extremas, isto é, com temperaturas demasiado baixas que impeçam a solubilização da tripalmitina, ou demasiado elevadas, que inactivem o biocatalisador. Além disso, ao fim de 24 h a reacção pode ter atingido o equilíbrio, o que pode explicar o facto da razão molar não ter efeito significativo na incorporação dos ómega-3 PUFA nos TAG.

Apesar do pouco efeito das variáveis em estudo no grau de incorporação da lipase “Lipozyme™ RM IM” sabe-se que, geralmente, ocorre um aumento do grau de incorporação molar com o aumento da razão molar e da temperatura (Lumor *et al.*, 2007). Assim, retiraram-se os pontos estrela da matriz central compósita rotativa (Quadro 5), obtendo-se uma matriz factorial completa com repetição do ponto central, e procedeu-se a uma nova análise dos resultados através do programa *Statistica TM*, da Stasoft, versão 5, USA.

No Quadro 6 estão representados os valores dos efeitos lineares das variáveis testadas e da interacção (temperatura x razão molar), após 24 horas de reacção com a lipase “Lipozyme™ RM IM”.

**Quadro 6** – Resultados dos efeitos lineares, e respectivos valores de  $p$ , das variáveis testadas (Temperatura, T, e razão molar, RM) e sua interacção na incorporação de ómega-3 PUFA na tripalmitina pela lipase “Lipozyme™ RM IM”.

| Factor | Efeito | Valor de $p$ |
|--------|--------|--------------|
| T (°C) | 1,7    | 0,1526       |
| RM     | 13,1   | 0,0033       |
| T x RM | 2,7    | 0,0682       |



**Figura 14** – Superfície de resposta relativa à incorporação molar de ómega-3 PUFA na tripalmitina, em função da temperatura (°C) e da razão molar, e respectiva projecção.

Através da análise do Quadro 6, pode-se verificar que a RM tem efeito altamente significativo e positivo na incorporação de ómega-3 PUFA ( $p= 0,0033$ ) e que a interacção TxRM também tem um efeito importante. Quanto à temperatura, apesar de  $p$  ser superior a 0,05, é uma variável que não deve ser retirada do modelo, uma vez que a sua interacção com a razão molar é importante. Estes resultados, sobre o efeito da temperatura, estão em



contradição com os de Lumor *et al.* (2007), que afirmam que o grau de incorporação molar aumenta com a temperatura. Segundo Xu *et al.* (2000), um aumento da temperatura da reacção resulta num efeito de aceleração das reacções catalisadas por enzimas, de acordo com a lei de Arrhenius. Provavelmente, a gama de temperaturas aplicada neste estudo não foi suficientemente alargada para permitir avaliar o efeito deste factor na reacção. Não obstante, sabe-se que o aumento da temperatura tem dois efeitos na reacção: primeiro, pode produzir colisões entre os reagentes e a enzima, resultando na incorporação de grupos acilo; segundo, pode também acelerar a inactivação enzimática (Dordick, 1989) e, consequentemente, produzir menos incorporação (Torres *et al.*, 2002a; Mu *et al.*, 1999).

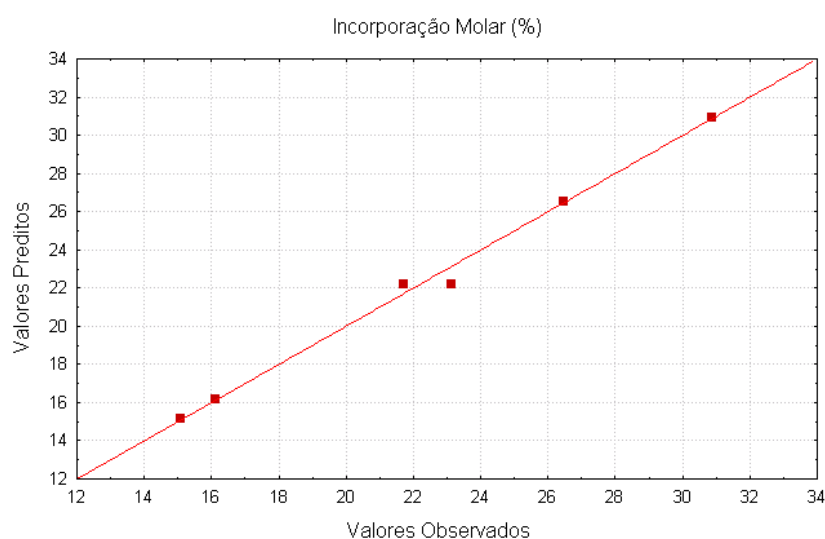
Na Fig.14, estão representadas a superfície de resposta relativa à incorporação molar de ómega-3 PUFA na tripalmitina, em função da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e da razão molar, e a sua respectiva projecção. Os valores mais elevados de incorporação de ómega-3 PUFA são obtidos aos valores mais elevados de T e RM testados.

Verifica-se que a incorporação de ómega-3 PUFA pode ser descrita por uma superfície planificada pelo seguinte polinómio de 1 $^{\circ}$  grau:

$$Inc(\%) = 59,34 - T - 16,1RM + 0,39(T \times RM) \quad (\text{Eq. 18})$$

$$(R^2 = 0,9938; R^2_{aj} = 0,9844)$$

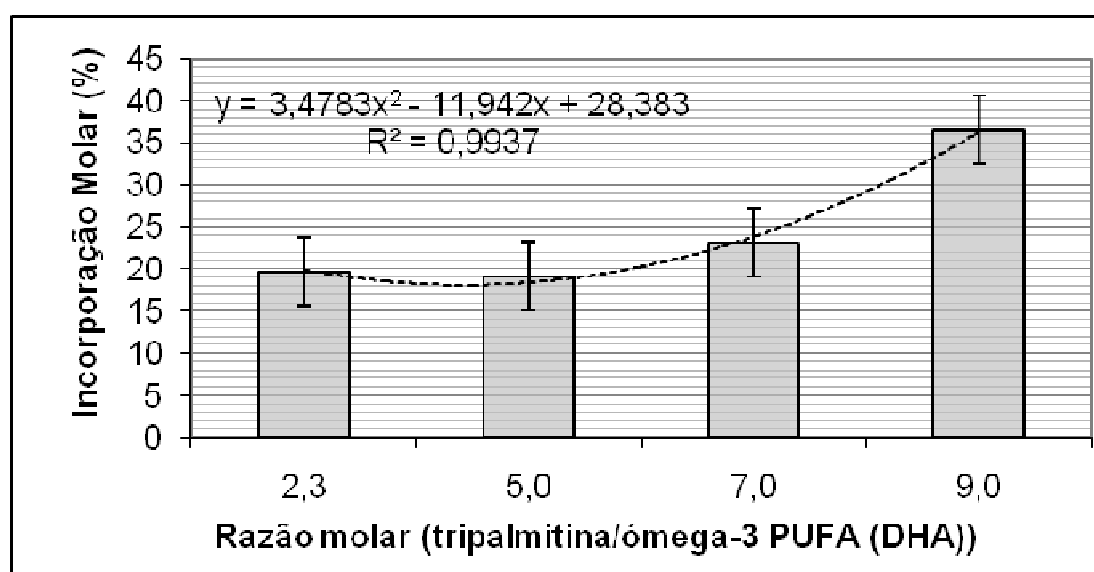
Os valores muito elevados de  $R^2$  e  $R^2_{aj}$  demonstram o excelente ajuste do modelo, o qual se pode confirmar pela Fig. 15, em que se observa uma relação linear entre os valores preditos pelo modelo e os observados experimentalmente.



**Figura 15** - Relação entre os resultados experimentais e os preditos pelo modelo.

No sentido de verificar o efeito do aumento da razão molar na incorporação de ómega-3 PUFA na tripalmitina, procedeu-se a novos ensaios com reacções de 24 h cada, a 70°C e com as razões molares de 1:5, 1:7 e 1:9 (*c.f.* 3.2.2.3). Ou seja, procedeu-se à optimização da incorporação segundo o método do declive mais acentuado do plano. A temperatura das reacções não foi superior a 70°C de modo a prevenir o risco de inactivação do biocatalisador.

A Fig.16 representa a tendência do aumento da incorporação molar de ómega-3 PUFA na tripalmitina pela lipase “Lipozyme™ RM IM”, com o aumento da razão molar, a 70°C.



**Figura 16** – Efeito da razão molar na incorporação de ómega-3 PUFA na tripalmitina, catalisada pela “Lipozyme™ RM IM”, a 70°C durante 24 horas.

Analisando a Figura 16 pode constatar-se que, sem variar a temperatura, quanto maior é a quantidade de AGL (ómega-3 PUFA) presente no meio reaccional, maior é o grau de incorporação molar. Estes resultados são coerentes com Maduko *et al.* (2007), em que a quantidade de ácido oleico incorporado também aumentou com o aumento da razão molar. A elevada incorporação de ómega-3 PUFA mais elevada foi obtida às 24 h de reacção, a 70 °C, com a razão molar mais elevada testada de tripalmitina/ómega-3 PUFA de 1:9.

É interessante verificar que no ensaio 6 da matriz central compósita rotativa inicialmente realizada (Quadro 5), se obteve um grau de incorporação superior e igual a 45,5%, a 72 °C, durante 24 h, com apenas uma razão molar 1:3. Isto pode dever-se ao facto de o aumento da temperatura promover a diminuição da viscosidade do meio, reduzindo as

limitações nas transferências de massa, e assim permitir maiores graus de incorporação (Martinek, 1993). Nas reacções de acidólise destinadas à produção de SL, o valor óptimo da razão molar óleo/ácido gordo varia, principalmente, com o biocatalisador e com o sistema reaccional utilizado. Num ensaio de acidólise entre trioleína e ácido cáprico, catalisada pela lipase comercial imobilizada de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme™ RM IM), em *n*-hexano, a diminuição da velocidade da reacção verificou-se para razões molares óleo/ácido caprílico superiores a 1:6, provavelmente devido à inibição do ácido (Camacho-Paez *et al.*, 2003).

O elevado teor em ácidos gordos livres poderá ter um efeito inibitório na enzima, com consequente aumento do tempo de reacção até se atingir o equilíbrio (Xu *et al.*, 2000). Neste estudo, quando a razão molar aumentou para valores na ordem dos 1:7, o equilíbrio pareceu ter-se deslocado no sentido de aumentar a incorporação molar (Fig.16). Mesmo quando ocorre um aumento significativo na incorporação com o aumento na quantidade de AGL utilizados, é importante notar que a presença de excesso de ácidos gordos, que não vão reagir, não é desejável em termos de pureza do produto obtido e do custo no processo de purificação (Ferreira-Dias, 2009). Do ponto de vista prático aumentar a razão molar implica aumentar o custo do substrato. Também se torna difícil a purificação do produto porque há uma grande quantidade de AGL misturados com os TAG finais que pretendemos recuperar.

## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

### 5.1. Conclusões gerais

Todos os biocatalisadores testados apresentaram actividade de acidólise na produção de lípidos estruturados, adequados como substitutos de gordura de leite materno, enriquecidos em ácidos gordos polinsaturados ómega-3.

Os resultados das actividades obtidas com os ensaios de interesterificação realizados com as preparações enzimáticas das lipases termostáveis, 1,3 selectivas, de *Thermomyces lanuginosa* ("Lipozyme™ TLIM") e de *Rhizomucor miehei* ("Lipozyme™ RMIM"), bem como, com a lipase imobilizada de *Candida antárctica* ("Novozym™435") e com a lipase/aciltransferase imobilizada de *Candida parapsilosis*, foram de 8,2mol%, 20,8mol%, 26,1mol% e 8,5 mol%, respectivamente. Com estes resultados, a "Novozym™435" e a "Lipozyme™ RMIM" revelaram ser biocatalisadores adequados para interesterificação de tripalmitina com ómega-3 PUFA. A lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis* e a

“Lipozyme™ TLIM” não parecem ter afinidade para a incorporação de ómega-3 PUFA, nas condições testadas.

Os testes de estabilidade operacional realizados com a lipase/aciltransferase imobilizada de *Candida parapsilosis* e com a lipase “Lipozyme RM IM”, em ensaios descontínuos de reutilização sucessiva, revelaram um comportamento que pode ser, descrito pelo modelo cinético de inactivação em série proposto por Sadana (1980) para a primeira, e um perfil de inactivação linear para a segunda.

Estimou-se que ao fim de 126,2 h, a actividade da lipase/aciltransferase imobilizada de *Candida parapsilosis*, se reduziu para metade da sua actividade inicial.

Relativamente à lipase termostável 1,3 específica, “Lipozyme™ RMIM”, apresentou-se mais estável que a anterior, com um tempo de meia vida de 278, 3 horas.

Pode constatar-se que não existe qualquer relação entre a actividade hidrolítica e a de interesterificação, das enzimas testadas. Apesar disso, a lipase termostável “Novozym™435” foi a mais coerente na relação entre a actividade hidrolítica e de interesterificação, revelando elevadas actividades tanto hidrolítica como de interesterificação. Dos biocatalisadores testados, a lipase “Lipozyme™ RMIM” parece ser mais adequada como catalisador da produção de lípidos estruturados para substitutos da gordura do leite materno. Isto deve-se à sua especificidade para as posições *sn*-1,3 que origina um elevado teor de ácido palmítico na posição *sn*-2 do TAG, logo melhor absorção de energia e cálcio (Tecelão *et al.*, submetido).

Dos ensaios de modelação da acidólise catalisada pela Lipozym™ RMIM, por RSM, pode-se concluir que a incorporação de ómega-3 PUFA é função linear da razão molar ómega-3 PUFA:tripalmitina, aumentando com ela e com a interacção entre este factor e a temperatura de reacção. Assim, os valores mais elevados de incorporação foram obtidos aos valores mais elevados de RM RM= 1:3,7) e de temperatura (70°C) testados nesses ensaios.

Quando se realizaram ensaios complementares, a 70°C e com razões molares até 1:9, o valor mais elevado de incorporação de ómega-3 PUFA, pela lipase “Lipozyme RM IM” foi obtida às 24 h de reacção, com a razão molar de 1:9 de tripalmitina/ómega-3 PUFA. Sem variar a temperatura, quanto maior é a quantidade de AGL (ómega-3 PUFA) presentes no meio reaccional, maior foi o grau de incorporação molar de ómega-3 PUFA.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a actividade de interesterificação varia com o catalisador. A selecção do biocatalisador adequado deve ser efectuada tendo em conta, não só a sua actividade, mas também a sua estabilidade operacional.

As características dos produtos obtidos, relativamente à composição em ácidos gordos, parecem ser adequadas para a utilização em formulações para lactentes. Assim, os resultados sugerem que, com a “Lipozyme™ RMIM”, é possível a produção de HMFS a partir de triacilmitina e de ómega-3 PUFA.

## 5.2. Sugestões para trabalhos futuros

Os estudos realizados nesta tese colocam a possibilidade de se prespectivarem trabalhos futuros, que se poderão basear nas seguintes sugestões:

- Testar novas misturas reaccionais, a submeter a interesterificação: óleo de palma (ou suas fracções) com outros óleos vegetais (*e.g.* óleo de girassol, azeite, óleo de bagaço de azeitona e óleo de amendoim), com concentrados de triacilgliceróis ricos em ómega-3 PUFA comerciais com composições diferentes em EPA e DHA, e outros produzidos por algas.
- Testar outras preparações enzimáticas imobilizadas, no sentido de encontrar preparações com elevada actividade de interesterificação e elevada estabilidade operacional, a menor custo que as preparações comerciais.
- Testar a lipase/aciltransferase imobilizada não só em Acurel, mas também noutros suportes, utilizando maiores cargas.
- Investigar os factores determinantes da desactivação enzimática, com vista ao seu controlo e à reactivação completa do biocatalisador (*e.g.* desidratação, inactivação por produtos de oxidação).
- Efectuar estudos com uma matriz deslocada RSM, em que se testem valores mais elevados de razão molar.
- Determinar os ácidos gordos na posição *sn*-2, no sentido de clarificar a selectividade da lipase de “Novozym™435” no sistema em estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adachi, S., Okumura, K., Ota, V., Mankura, M., (1993), Acidolysis of sardine oil by lipase to concentrate eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in glycerides, *J. Ferment. Bioeng.*, **75**: 259–264.
- Adlercreutz, D., Budde, H., Wehtje, E., (2002), Synthesis of phosphatidylcholine with defined fatty acid in the *sn*-1 position by lipase-catalyzed esterification and transesterification reaction, *Biotechnol. Bioeng.*, **78**: 403-411.
- Agostini, C., (2003), Compliance of present recommendations of fatty acids in formulas for term infants with the actual human milk fatty acid composition in different populations, *Acta Paediatr.*, **92**: 785-789.
- Akimmoto, K., Yaguchi, T., Fujikawa, S., (1999), Novel triglyceride nd composition comprising the same (European Patent 0965 578 A1).
- Akoh, C. C. (2002), Structured lipids *In: Food Lipids*, (Akoh, C. C., Min, D. B., Eds.), Dekker, New York (EUA), pp 877-908.
- Akoh, C. C., Xu, X. (2002), Enzymatic production of Betapol and other specialty fats. *In: Lipid Biotechnology*, (Kuo, T. M., Gardner, H.W., Eds.), Dekker, New York (EUA), pp 461-478.
- Bailey, J.E., Ollis, D.F., (1986), Applied enzyme catalysis. *In: Biochemical Engineering Fundamentals*, (Verma, K., Martin, C.C.), McGraw-Hill International Editions., pp. 157-227.
- Basu, H., Pernecky, S., Sengupta, A., Liepa, G.U., 2006, Coronary heart disease: how do the benefits of  $\omega$ -3 fatty acids compare with those of aspirin, alcohol/red wine, and statin drugs?, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **83**: 985-997.
- Bloomer, S., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., (1991), Triglyceride interesterification by lipases, *Biocatalysis*, **5**: 145-162.
- Bloomer, S., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., (1992), Kiylogram-scale ester synthesis of acyl donor and use in lipase-catalyzed interesterification, *JAOCS*, **69** (10): 966-973.
- Boswinkel, G., Derksen, J. T. P., van't Riet, K., & Cuperus, F. P., (1996), Kinetics of acyl migration in monoglycerides and dependence on acyl chainlength, *Journal of the American Oil Chemists Society*, **73**: 707–711.
- Briand, D., Dubreucq, E., Galzy, P. (1995), Functioning and regioselectivity of the lipase of *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron and Talice in aqueous medium,

New interpretation of regioselectivity taking acyl migration into account, *Eur. J. Biochem.*, **228**: 169-175.

- Brunel, L., Neugnot, V., Landucci, L., Boze, H., Moulin, G., Bigey, F., Dubreucq, E., (2004), High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*, *J. Biotechnol.*, **111**: 41-50.
- Bryhn, M.D., (2006), Polyunsaturated fatty acids in infant nutrition, *Copyright Epax AS*, 1-8.
- Camacho-Paez, B., Robles, M. A., Camacho, R.F., Esteban, C. L., Molina, G. E., (2003), Kinetics of lipase-catalysed interesterification of triolein and caprylic acid to produce structured lipids, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **78**: 461-470.
- Campos, L., (1998), Entender a Bioquímica: o metabolismo fundamental em animais e plantas, Escolar Editora, Lisboa, pp. 290.
- Carlson, S. E., (1996), Arachidonic acid status of human infants: influence of gestational age at birth and diets with very long chain n-3 and n-6 fatty acids, *J. Nutr.*, **126**:1092S–1098S.
- Carvajal, O., Angulo, O., (1997), Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on the lipidic profile of healthy Mexican volunteers, *Salud Publica Mex.*, **39** (3): 221-224.
- Chambon, M., (1996), Milk Fat - Sources of the main fats and relevant monographs, cap.3 *In: Oils and fats manual: a comprehensive treatise*, vol. 1., Karleskind, A. (ed.), pp. 277-286, Intercept Ltd., Hampshire, UK.
- Chapus, C., Semériva, M., Bovier-Lapierre, C., Desnuelle, P., (1976), Mechanism of pancreatic lipase action, 1, Interfacial activation of pancreatic lipase, *Biochemistry*, **15**: 4980-4987.
- Cho, F., deMan, J., Allen, O.B., (1994), Physical properties and composition of low trans canola/palm blends modified by continuous enzymatic interesterification, *Elaies*, **6**: 39-49.
- Christensen, T.C., Hølmer, G., (1993), Lipase catalyzed acylexchange reactions of butter oil, *Milchwissenschaft-Milk Science International*, **48**: 543–547.
- Christie, W. W. (1995). *In: P. F. Fox (Ed.), Advanced dairy chemistry-2: Lipids*, London: Chapman & Hall.
- Chu, Yan-Haw., Hwang, L. S., (2002), Food Lipids, cap.6 *In: Chemical and Functional Properties of Food Components*, 2nd Ed., (Zdzislaw E.S., ed.), pp. 115-132, CRC Press, New York (United States of America).
- Connor, W. E.; Neuringer, M.; and Reisbeck, S., (1992), Essential FA: the importance of n-3 FA in the retina and brain, *Nutr. Rev.*, **50**: 21.

- Correia, A.C., Ferreira-Dias, S., (1998), The effect of impurities of crude olive residue oil on the operational stability of the *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams, *In: Stability and Stabilization of Biocatalysts* (A. Ballesteros, F.J. Plou, Iborra, J.L., P. Halling, eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 71-76.
- Da Silva, R.C., Escobedo, J.P., Albuquerque, E.M., Gioielli, L.A., (2007), Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físicoquímicas de sua gordura, *Quim.Nova*, Vol.XY, No.00,1-x,200.
- Dalla-Vecchia, R., Nascimento, M.G., Soldi, V., (2004), *Quim. Nova*, **27**: 623.
- Dordick, J. S., (1989), Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents, *Enzyme Microb. Technol.*, **11**: 194–211.
- Droste, P.D., (1996), Fatty Acids - Transformation of fats for non-alimentary applications *In: Oils and fats manual: a comprehensive treatise*, vol.2, Karleskind, A. (ed.), pp. 1046-1081, Intercept Ltd., Hampshire, UK.
- Dünhaupt, I.J., Heinzle, E., Ingham, J., Prenosil, J.E., (1992), *Biological Reaction Engineering*, pp. 56-59.
- Erickson, M.D., (1995), Interesterification. *In: Practical handbook of soybean processing and utilization*, (Erickson D.R., ed.), AOCS Press and United Soybean Board, pp. 277-296.
- Ferreira-Dias, S., (2008), The Use of Immobilised Lipases in the Food Industry-Factors and Facts, *In: Current Topics on Bioprocesses in Food Industry*, Vol. II, chapter 8, (Koutinas, A., Pandey, A., Larroche, C., eds.), Asiatech Publishers Inc., New Deli (India), pp. 105-131
- Ferreira-Dias, S., (2009), Enzymatic Production of Functional Fats, *In: Food Biotechnology*, (A. Pandey, C. Larroche, C.R. Soccol, E. Gnansounou, P Nigam, eds.), Asiatech Publishers Inc., New Deli (India).
- Ferreira-Dias, S., da Fonseca, M. M. R., (1995), Production of monoglycerides by glycerolysis of olive oil with immobilized lipases: Effect of the water activity, *Bioprocess Eng.*, **12**: 327–337.
- Ferreira-Dias, S., Correia, A.C., da Fonseca, M.M.R., (2003), Response surface modeling of glycerolysis catalysed by *Candida rugosa* lipase immobilized in different polyurethane foams for the production of partial glycerides, *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **21**: 71-80.
- Fomuso, L.B., Akoh, C.C., (1997), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**: 269.
- Fomuso, L. B., Akoh, C. C., (2002), Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bioreactor, *Food Res. Int.*, **35**: 15-21.



- Fonseca, M.M.R., Osório, N.M.F.R.M., Ferreira-Dias, S., (2001), Processo contínuo de transesterificação de gorduras catalisado por lipases, Portuguese Patent 102638.
- Forssell, P., Kervinen, R., Lappi, M., Linko, P., Suortti, T., Poutanen, K., (1992), Effect of enzymatic interesterification on the melting point of tallow-rape seed oil (LEAR) mixture, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**: 126-129.
- Forsyth, J. S. (1998), Lipids and infant formulas, *Nutr. Res. Rev.*, **11**:255–278.
- Frankel, E. N., (1995), Natural and biological antioxidants in foods and biological systems, Their mechanism of action, applications and implications, *Lipid Technology*, 77–80.
- Gamboa, O.W.D., Gioielli, L.A. (2006), Comportamento de cristalização de lípidios estruturados obtidos a partir de gordura de palmiste e óleo de peixe, *Quím.Nova*, **29** (4): 646-653.
- Ghosh, S., Bhattacharyya, D. K., (1997), Utilization of high-melting palm stearin in lipase-catalyzed interesterification with liquid oils, *J Am Oil Chem Soc.*, **74**: 589–592.
- Graille, J., Pina, M., Montet D., (1998), Biotechnology of lipids: some possible applications, *Oleagineux*, **43**:188–190.
- Guillems, T.G., (2000), Fatty Acids: Essential...Therapeutic, *The Standard*, **3** (2):1-8.
- Hamam, F., Shahidi, F., (2005), Enzymatic incorporation of capric acid into a single cell oil rich in docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid and oxidative stability of the resultant structured lipid, *Food Chem.*, **91**: 583-591.
- Hamam, F., Shahidi, F., (2008), Incorporation of selected long-chain fatty acids into trilinolein and trilinolenin, *Food Chemistry*, **106**: 33-39.
- Hasler, C.M. (1998), Functional foods: their role in disease prevention and health promotion, *Food Technol*, **52** (11): 63-70.
- Haumann, B.F., (1994), Tools: hydrogenation, interesterification, *INFORM*, **5** (6): 668-678.
- Heisler, A., Rabiller, C., & Hublin, L., (1991), Lipase catalyzed isomerisation of 1,2-(2,3)-diglyceride into 1,3-diglyceride. The crucial role of water., *Biotechnology Letters*, **13**: 327–332.
- Helland, I.B, Smith, L., Saarem, K., Saugstad, O.D., Drevon, C.A., (2003), Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age, *Pediatrics*, **111**: e39-e99.
- Holm, H.C., Cowan, D., (2008), The evolution of enzymatic interesterification in the oils and fats industry, *Eur.J.Lipid Sci.Technol.*, **110**: 679-691.

- Horrocks, L. A., Yeo, Y. K. (1999), Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol. Res.*, **40**: 211-225.
- Howlett, J. (2008), Functional Foods: From Science to Health and Claims. P. Aggett (eds.), ILSI Europe publications, pp.36
- Huang, K., Akoh, C. C., (1994), Lipase-catalyzed incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into vegetable oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**: 1277–1280.
- Hustedt, H. H., (1976), Interesterification of edible oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **53**: 390–392.
- Innis, S.M., (2008), Dietary omega-3 fatty acids and the developing brain, *Brain Research*, **1237**:35-43.
- Innis, S. M., Dyer, R., Quinlan, P., Diersen-Schade, D., (1995), Palmitic acid is absorbed as *sn*- 2 monopalmitin from milk and formula with rearranged triacylglycerols and results in increased plasma triglyceride *sn*-2 and cholesteryl ester palmitate in piglets, *J. Nutr.*, **125**: 73-81.
- Innis, S.M., Vaghri, Z., King, D.J., (2004), n-6 Docosapentaenoic acid is not a predictor of low docosahexaenoic acid status in Canadian preschool children, *Am. J. Clin. Nutr.*, **80**:768–773.
- Jaeger, K-E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, M., (1994), Bacterial lipases, *FEMS Microbiol. Rev.*, **15**: 29–63.
- Jennings, B.H., Akoh, C.C., (2000), Lipase-Catalyzed Modification of Rice Bran Oil to Incorporate Capric Acid, *J. Agric. Food Chem*, **48**: 4439-4443.
- Jensen, R.G., (1989), Lipids in human milk—Composition and fatsoluble vitamins *In*: Textbook of Gastroenterology and Nutrition in Infancy, 2<sup>nd</sup>ed, (Lebenthal, E., ed.), Raven Press, New York (United States of America), pp: 157–208.
- Jensen, R.G., (1999), Lipids in human milk, *Lipids*, **34**: 1243-1271.
- Jensen, R.G., (2001), Infant formulas *In*: Structured and Modified Lipids, (Gunstone, F. D., Ed.), Dekker, New York, pp 455-464.
- Jornal Oficial das Comunidades Europeias de 1991, N°L248/44
- Karabulut, I., Turan, S., Vural, H., Kayahan, M., (2007), Human milk fat substitute produced by enzymatic interesterification of vegetable oil blend, *Food Technol.Biotechnol.*, **45**(4): 434-438.
- Kazlauskas R.J., Bornscheuer U.T. (1998), Biotransformations with lipases, *In*: *Biotechnology*, (Rhem H.J., Pihler, G., Stadler, A. e Kelly, P.J.W., eds.), New York, **vol. 8**, pp. 37-191.

- Kennedy, K., Fewtrell, M. S., Morley, R., Abott, R., Quinlan, P. T., Wells, J. C. K., Bindels, J. G., Lucas, A., (1999), Double-blind, randomized trial of a synthetic triacylglycerol in formula-fed term infants: Effects on stool biochemistry, stool characteristics and bone mineralization, *Am. J. Clin. Nutr.*, **70**:920–927.
- Kim, I. H.; Ko, S. N.; Lee, S. M.; Chung, S. H.; Kim, H.; Lee, K. T.; Ha, T. Y., (2004), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **81**: 537.
- Kim, B.H., Akoh, C.C., (2005), Modeling of lipase-catalyzed acidolysis of sesame oil and caprylic acid by response surface methodology: optimization of reaction conditions by considering both acyl incorporation and migration, *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 8033-8037.
- Kim, B.H., Akoh, C.C., (2006), Characteristics of structured lipid prepared by lipase-catalyzed acidolysis of roasted sesame oil and caprylic acid in a bench-scale continuous packed bed reactor, *J. Agric. Food Chem.*, **54**: 5132-5141.
- Klibanov, A.M., (1986), Enzymatic reaction in organic media *In: Protein Engineering Application in Science, Medicine and Industry*, (Inouye M., Sarma R., Eds.), Academic Press, Inc, pp. 341-349.
- Kodali, D. R., Tercyak, A., Fahey, D. A., & Small, D. M., (1990), Acyl migration in 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol, *Chemistry and Physics of Lipids*, **52**: 63–170.
- Konishi, H., Neff, W. E., Mounts, T. L., (1993), Chemical interesterification with regioselectivity for edible oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**: 411–415.
- Kremer, J.M., Lawrence, D.A., Jubiz, W., DiGiacomo, R., Rynes, R., Bartholomew, L.E., Sherman, M., (1990), Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheu.*, **33**: 810-820.
- Lee, K.T., Akoh, C.C., (1998), Structured lipids: synthesis and applications, *Food Rev Int.*, **14**(1):17-34.
- Linfield, W. M., (1988), Enzymatic Fat Splitting *In: Proceedings of World Conference on Biotechnology for the Fats and Oil Industry*, (Apple White, T. H., ed.), *Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, IL, USA, pp. 131-133.
- Lopez-Hernandez, A., Otero, C., Hernández-Martín, E., Garcia, H.S., Hill Jr., C.G., (2007), Interesterification in batch and continuous flow processes of sesame oil and fully hydrogenated fat catalyzed by immobilized lipase, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **109**: 1147-1159.
- Lumor, S.E., Akoh, C.C., (2005), Incorporation of  $\gamma$ -linolenic and linoleic acids into palm kernel oil/palm olein blend, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **107**: 447-454.
- Lumor, S.E., Jones, K.C., Ashby, G., Strahan, G.D., Kim, B.E., Lee, G-C., Shaw J-F., Kays, S.E., Chang S-W., Foglia, T.A., Akoh, C.C., (2007), Synthesis and

Characterization of Canola Oil#Stearic Acid-Based Trans-Free Structured Lipids for Possible Margarine Application, *J. Agric. Food Chem.*, **55** (26): 10692-10702.

- Luna, P., Juárez, M., De la Fuente, M.A., (2007), Fatty acid and conjugated linoleic acid isomer profiles in human milk fat, *Eur.J.Lipid Sci. Technol.*, **109**: 1160-1166.
- Macrae, A.R., (1983), Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **60**: 291-294.
- Macrae, A. R., (1985), Interesterification of fats and oils *In: Biocatalysts in Organic Syntheses*, (Tramper, J., van der Plas, H. C., Linko, P., Eds.), Proceedings of an International Symposium held at Noorwijkerhout, , Elsevier Science Publishers, Amsterdam (Netherlands), pp:195–208.
- Maduko, C.O., Akoh, C.C., Park, Y.W., (2007), Enzymatic interesterification of tripalmitin with vegetable oil blends for formulation of caprine milk infant formula analogs, *J. Dairy Sci.*, **90**: 594–601.
- Makrides, M., Neumann, M. A., Gibson, R. A., (1996), Is dietary docosahexaenoic acid essential for term infants, *Lipids*, **31**:115–119.
- Malcata, F.X., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G., Amundson, H., (1990), Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils - a review, *JAOCS*, **67** (12): 890-910.
- Martinek, K., (1993), Need for thermostability, its benefits and main strategies for thermostabilization, *In: Thermostability of Enzymes*, (Gupta, M. N., Ed.), Springer, Berlin, Germany, pp. 76–82.
- Megraud, F., Boudara G., Bessand K., Bensid S., Dabis F., Soltana R., Touhahmi M. (1990), Incidence of bacterial infection in infants in Western Algeria and the possible protective role of breastfeeding, *J. Epidemiol. Infect.*, **105**: 73–78.
- Mittelbach, M., (1990), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**: 168–170.
- Miura, S., Ogawa, A., Konishi, H., (1999), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**: 927.
- Mojoví, L., Šiler-Marinková, S., Kukic, G., Vunjak-Novaković, G., (1993), Rhizopus arrhizus lipase-catalyzed interesterification of the midfraction of palm oil to a cocoa butter equivalent fat, *Enzyme Microb. Technol.*, **15**: 438-443.
- Montgomery, D. C., (1997), Design and Analysis of Experiments, 4<sup>th</sup> ed., Wiley: New York, pp 575-625.
- Moreno, P.A., Medina, A.R., Rubio, F.C., Páez, B.C., Grima, E.M., (2004), Production of structured lipids by acidolysis of an EPA-enriched fish oil and caprylic acid in a packed bed reactor: analysis of three different operation modes, *Biotechnol. Prog.*, **20**: 1044-1052.

- Mu, H., Xu, X., Høy, C.E., (1998), Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a laboratory-scale continuous reactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**: 1187-1193.
- Mu, H., Xu, X., Adler-Nissen, J., Høy, C.E., (1999) Production of structured lipids by lipase-catalyzed interesterification in a packed bed reactor: effect of reaction parameters on the level of diacylglycerols in the products. *Lipid-Fett*, **101**: 158-164.
- Muderhwa, J.M., Pina, M., Montet, D., Feuillard, P., Graille, J., (1989), *Oléagineux*, **43** (11): 427-433.
- Muggli, R., (2008), EPA and DHA- two nature's health workers, *Inform- Special Supplement Health and Nutrition*, **1**: 8-11.
- Mukesh, D., Banerji, R., Newadkar, R., Bevinakatti, H.S., (1993), Lipase catalysed transesterification of vegetable oils – a comparative study in batch and tubular reactors. *Biocatalysis*, **8**: 191-199.
- Mukherjee, K.D., Kiewitt, I. (1998), Structured triacylglycerols resembling human milk fat by transesterification catalyzed by papaya (*Carica papaya*) latex, *Biotechnol. Lett.*, **20**: 613-616.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., (2002) Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, Wiley: New York.
- Nascimento, A.C., Tecelão, C.S.R., Gusmão, J.H., da Fonseca, M.M.R., Ferreira-Dias, S., (2004), Modelling lipase-catalysed transesterification of fats containing *n*-3 fatty acids monitored by their Solid Fat Content, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **106**: 599-612.
- Nestel, P.J., (2000), Fish oil and cardiovascular disease: lipids and arterial function, *Am J Clin Nutr*, **71**(Suppl):228S-31S.
- Nielsen, N.S., Yang, T., Xu, X., Jacobsen, C., (2006), Production and oxidative stability of a human milk fat substitute produced from lard by enzyme technology in a pilot packed-bed reactor, *Food Chem.*, **94**: 53-60.
- O'Shea, M., Gerritsen, J., Mohede, I. (2005), Clinical benefits of a structured lipid (*Betapol*) in infant formula. In: *Handbook of Functional Lipids*, (Akoh, C. C., Ed.) CRC Taylor & Francis Group, New York (EUA), pp 261-278.
- Osborn, H.T., Akoh, C.C., (2002), Structured Lipids- Novel fats with medical, nutraceutical, and food applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **3**: 93-103.
- Osório, N.M., (2008), Estudos de interesterificação de gorduras enriquecidas em ácidos gordos ômega-3, catalisada por lipases imobilizadas, Tese de Doutorado, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, pp 1-44.

- Osório, N.M., Ferreira-Dias, S., Gusmão, J.H., da Fonseca, M.M.R., (2001), Response surface modelling of the production of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids enriched fats by a commercial immobilized lipase, *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **11**: 677-686.
- Osório, N.M., Gusmão, J.H., da Fonseca, M.M., Ferreira-Dias, S., (2005), Lipase-catalysed interesterification of palm stearin with soybean oil in a continuous fluidised-bed reactor, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **107**: 455-463.
- Osório, N.M., da Fonseca, M.M., Ferreira-Dias, S., (2006), Operational Stability of *Thermomyces lanuginosa* Lipase during Fats Interesterification in Continuous-Packed-Bed Reactors, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **108**: 545-553
- Osório, N.M., Dubreucq, E., da Fonseca, M.M., Ferreira-Dias, S. (2009a), Lipase/acyltransferase-catalysed interesterification of fat blends containing ômega-3 polynsaturated fatty acids, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **111**: 120-134 (doi: 10.1002/ejlt.200800109).
- Osório, N.M., Dubreucq, E., Da Fonseca, M.M., Ferreira-Diaz, S., (2009b), Operational Stability of Immobilised Lipase/acyltransferase during Interesterification of Fat Blends, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **111**: 358-367.
- Parker, K. J., Birch, G. G., (1983). Control of food quality and food analysis. *Elsevier Applied Science Publishers*, London & New York, pp. 226-229.
- Pavareesh, F., Robert, H., Thomas, D., Legoy, M.D., (1992), Gas-phase transesterification reactions catalyzed by lipolytic enzymes, *Biotechnol. Bioeng.*, **39**: 467-473.
- Petersson, A. E. V., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., (2007), A water activity control system for enzymatic reactions in organic media, *Biotechnol. Bioeng.*, **97**: 235-241.
- Pigott, G.M., Tucker, B.W., (1987), Science Opens New Horizon for Marine Lipids, in Human Nutrition, *Food Rev. Inter.*, **3**: 105±138.
- Pires-Cabral, P., da Fonseca, M.M.R., Ferreira-Dias, S., (2007), Modelling the Production of Ethyl Butyrate Catalysed by *Candida rugosa* Lipase Immobilised in Polyurethane Foams, *Biochemical Engineering Journal*, **33**: 148-158.
- Podmore, J., (1987), Application of modification techniques *In: Recent advances in chemistry and technology of fats and oils*, (Hamilton, R. J. e Bhati, A., Eds.), Elsevier Applied Science, London & New York, pp. 167-181.
- Posorske, L.H., LeFebvre, G.K., Miller, C.A., Hansen, T.T., Glenvig, B.L., (1988), Process considerations of continuous fat modification with an immobilized lipase, *J. Am Oil Chem. Soc.*, **65**: 922-926.

- Prieto, J. G., DePeters, E. J., Robinson, P. H., Santos, J. E., Pareas, J. W., Taylor, S. J., (2003), Increasing dietary levels of cracked pima cottonseed increase plasma gossypol but do not influence productive performance of lactating Holstein cows, *Journal of Dairy Science*, **86**: 254-267.
- Quinlan, P., (1993), Modification of triglycerides by lipases: process technology and its application to the production of nutritionally improved fats, *INFORM*, **4**(5): 580-585.
- Quinlan, P.T., Lockton, S., Irwin, J., Lucas, A. L., (1995), The relationship between stool hardness and stool composition in breast and formula-fed infants., *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.*, **20**:81–90.
- Rao, R., Manohar, B., Sambaiah, K., Lokesh, B. R., (2002), Enzymatic acidolysis in hexane to produce n-3 or n-6 fa-enriched structured lipids from coconut oil: optimization of reactions by response surface methodology. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **79**: 885-890.
- Rattray, J. B. M., (1984), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**: 1701–1711.
- Reyes, H. R., Hill, C. G. Jr., (1994), Kinetic modeling of interesterification reactions catalyzed by immobilized lipase, *Biotechnol. Bioeng.*, **43**: 171–182.
- Riaublanc, R., Ratomahenina, R., Galzy, P., Nicolas, M., (1993), Peculiar properties from *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron Talice, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**: 497–500.
- Roche, H.M., Gibney, M.J., (2000), Effect of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on fasting and postprandial triacylglycerol metabolism. *Am J Clin Nutr*, **71**(Suppl):232S-7S.
- Rosevear, A., Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S., Hilger, A., (1987), Types of stability *In: Immobilised Enzymes and Cells*, Bristol and Philadelphia, pp:148-170.
- Ruxton, C.H.S., Reed, S.C., Simpson, M.J.A., Millington, K.J., (2007), The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence, *J Hum Nutr Dietet*, **20**:275-285.
- Sadana, A. (1980), A desactivation model for immobilized and soluble enzymes, *Biotechnol Letters*, **2**: 279-284.
- Sahín, N., Akoh, C.C., Karaali, A., (2005a), Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with hazelnut oil fatty acids and stearic acid to produce human milk fat substitutes, *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 5779-5783.
- Sahín, N., Akoh, C.C., Karaali, A., (2005b), Enzymatic production of human milk fat substitutes, containing g-linolenic acid: optimization of reactions by response surface methodology, *J. Am Oil Chem. Soc.*, **82**: 549-557.

- Sahín, N., Akoh, C. C., Karaali, A. (2006), Human milk fat substitutes containing omega-3 fatty acids, *J. Agric. Food Chem.*, **54**: 3717-3722.
- Sellapan, S., Akoh, C., (2001), Synthesis of structured lipids by transesterification of trilinolein catalysed by Lipozyme IM60, *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 2071-2076.
- Semériva, M., Chapus, C., Bovier-Lapierre, C., Desnuelle, P., (1976), On the transient formation of an acetyl enzyme intermediate during the hydrolysis of *p*52 nitrophenyl acetate by pancreatic lipase, *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, **58**: 808-813.
- Semériva, M., Desnuelle, P., (1979), Pancreatic lipase and colipase, An example of heterogeneous biocatalysis, *Adv. Enzymol.*, **48**: 319-370.
- Senanayake, S.P.J., Shahidi, F., (2002), Structured lipids via lipase-catalyzed incorporation of eicosapentaenoic acid into borage (*Borago officinalis* L.) and evening primrose (*Oenothera biennis* L.) oils, *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 477-483.
- Shieh, C. J., Akoh, C. C., Koehler, P. E., (1995), Four-factor response surface optimization of the enzymatic modification of triolein to structured lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**: 619-623.
- Shimada, Y., Sugihara, A., Maruyama, K., Nagao, T., Nakayama, S., Nakano, H., Tominaga, Y., (1996), Production of structured lipid containing docosahexaenoic and caprylic acids using immobilized *Rhizopus delemar* lipase, *J. Ferm. Bioeng.*, **81**: 299-303.
- Shimada, Y., Nagao, T., Hamasaki, Y., Akimoto, K., Sugihara, A., Fujikawa, S., Komemushi, S., Tominaga, Y., (2000), Enzymatic synthesis of structured lipid containing arachidonic and palmitic acids, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **77**: 89-93.
- Silva R.C., Cotting L.N., Poltronieri T.P., Balcão V.M., de Almeida D.B., Gonçalves L.A.G., Grimaldi R., Gioielli L.A. (2009), The effects of enzymatic interesterification on the physical-chemical properties of blends of lard and soybean oil, *LWT- Food Sci. Technol.*, **42**: 1275-1282.
- Simopoulos, A.P., (1998), Overview of evolutionary aspects of  $\omega$ -3 fatty acids in the diets. *In: The Return of  $\omega$ -3 Fatty Acids into the Food Supply, I, Land-based Animal Food Products and their Health Effects*, (Simopoulos A.P, Ed.), *World Rev. Nutr. Diet.*, Basel (Switzerland), pp. 1-11.
- Sjursnes, B. J., & Anthonsen, T., (1994), Acyl migration in 1,2-dibutyryl dependence on solvent and water activity, *Biocatalysis*, **9**: 285-297.



- Soumanou, M.M., Bornscheuer, U.T., Menge, U., Schmid, R.D., (1997), Synthesis of structured triglycerides from peanut oil with immobilized lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**:427-433.
- Srivastava, A., Akoh, C.C., Chang, S-W., Lee, G-C., Shaw, J-F., (2006), *Candida rugosa* lipase LIP1-catalyzed transesterification to produce human milk fat substitute, *J. Agric. Food Chem.*, **54**: 5175-5181.
- Svensson, I., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., (1992), Lipase-catalysed transesterification of phosphatidylcholine at controlled water activity, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**:986-991.
- Tecelão, C., Silva, J., Dubreucq, E., Ribeiro, M.H., Ferreira-Dias, S., Production of Human Milk Fat Substitutes enriched in Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids using Immobilized Commercial Lipases and *Candida parapsilosis* Lipase/Acyltransferase, *Journal of Molecular Catalysis- B Enzymatic* (submetido a 31 de Agosto de 2009).
- Torres, C. F., Munir, F., Blanco, R. M., Otero, C., Jr, C. G. H., (2002a), Catalytic transesterification of corn oil and tristearin using immobilized lipases from *Thermomyces lanuginose*, *J Am Oil Chem Soc.*, **79**: 775–781.
- Torres, C.F., Hill, Jr. C.G., (2002b), Lipase-catalyzed acydolysis of menhaden oil with conjugated linoleic acid: effect of water content, *Biotechnol. Bioeng.*, **78**: 509-516.
- Torres, C.F., Lin, B., Moeljadi, M., Hill Jr., C.G., (2003), Lipase-catalyzed synthesis of designer acylglycerols rich in residues of eicosapentaenoic, docosahexaenoic, conjugated linoleic, and/or stearic acids, *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, **105**: 614-623.
- Turan, S., Karabulut, I., Vural, H., (2006), Effects of reaction parameters on the incorporation of caprylic acid into soybean oil for production of structured lipids, *J. Food Lipids*, **13**: 306-317.
- Ucciani, E., Debal, A., (1996), Chemical properties of fats, *In: Oils and Fats Manual*, Vol.I, (A. Karlesking, ed.), pp.1-65, Lavoisier Publishing, Paris (França).
- Ujang, Z., Vaidya, A. M., (1998), Stepped water activity control for efficient enzymatic interesterification, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**: 318-322.
- Valenzuela B. A., 2009, Docosahexaenoic acid (DHA), an essential fatty acid for the proper functioning of neuronal cells: their role in mood disorders, *Grasas y Aceites*, **60**: 203-212.
- Valivety, R.H., Halling, P.J., Peilow, A.D., Macrae, A.R., (1992), Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity, *Biochim. et Biophys. Acta.*, **1122**: 143-146.
- Villeneuve, P., Barouh, N., Baréa, B., Piombo, G., Figueroa-Espinoza, M.C., Turon, F., Pina, M., Lago, R., (2007), Chemoenzymatic synthesis of structured

triacylglycerols with conjugated linoleic acids (CLA) in central position, *Food Chem.*, **100**: 1443-1452.

- Wagner, C.L., Graham, E.M., (2004), HopeWW.Human breastmilk and lactation.E-Medicin: (<http://www.emedicine.com/ped/topic2594.htm#section~bibliography>.)
- Wang, Y., Gordon, M.H., (1991), Effect of lipid oxidation products on the transesterification activity of an immobilized lipase, *J. Agric. Food Chem.*, **39**: 1693-1695.
- Ward, O.P., Singh, A., (2005), Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production, *Process Biochemistry*, **40**: 3627-3652.
- Weber, P.C., Leaf, A., (1991) World Review of Nutrition and Dietetics *In: Health Effects of  $\omega$ -3 Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods*, (A.P. Simopoulos, R.E. Martin, S.M. Barlow, eds.), **66**: 218-232.
- Weisberg S., (1985), Applied Linear Regression, John Wiley & Sons, 216-219.
- Willis, W.M., Lencki, R. W., Marangoni, A. G., (1998), Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils, *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.*, **38**: 1-36.
- Willis, W.M., Marangoni, A.G., (1999), Assessment of lipase – and chemically catalyzed lipid modification strategies for the production of structured lipids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76** (4): 443-450.
- Wisdom, R.A., Dunnill, P., Lilly, M.D., (1987), Enymic interesterification of fats: laboratory and pilot-scale studies with immobilized lipase from *Rhizopus arrhizus*, *Biotechnology and Bioengineering*, **29**: 1081-1085.
- Xu, X., (2000), Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **102**: 287–303.
- Xu, X., (2003), Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **105**: 289-304.
- Xu, X., Balchen, S., Høy, C.-E., Adler-Nissen, J., (1998a), Pilot batch production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification: preliminary study on incorporation and acyl migration, *JAOCS*, **75** (2): 301-308.
- Xu, X., Balchen, S., Høy, C.-E., Adler-Nissen, J., (1998b), Production of specific structured lipids by enzymatic interesterification in a pilot continuous enzyme bed reactor. *J. Am Oil Chem. Soc.*, **75**: 1573-1579.
- Xu, X., Skands, A. R. H., Adler-Nissen, J., Høy, C.-E., (1998c) Production of specific structured lipids by enzymatic interesterification: optimization of the reaction by response surface design, *Fett/Lipid*, **100**: 463-471.

- Xu, X., Mu, H., Hoy, C. E., Adler-Nissen, J., (1999), Production of specifically structured lipids by enzymatic interesterification in a pilot enzyme bed reactor: process optimization by response surface methodology. *Fett/Lipid*, **101**: 207-214.
- Xu, X., Fomuso, L. B., Akoh, C. C., (2000), Modification of menhaden oil by enzymatic acidolysis to produce structured lipids: optimization by response surface design in a peacked bed reactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **77**: 171-176.
- Xu, X., Porsgaard, T., Zang, H., Adler-Nisse, J., Hoy, C.-E., (2002), Production of structured lipids in a packed-bed reactor with *Thermomyces lanuginosa* lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **79**: 561–565.
- Yamane, T., (1987), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**: 1657–1662.
- Yamane, T., (1988), Importance of moisture contens control for enzymatic reactions in organic solvents, A noval concept of “microaqueous”, *Biocatalysis*, **2** (1): 1-8.
- Yang, T.H., Jan, Y., Han, J.J., Rhee, J.S., (2001), Enzymatic synthesis of low-calorie structured lipids in a solvent-free system, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **78**: 291-296.
- Yang, T., Xu, X., He, C., Li, L., (2003), Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes, *Food Chem.*, **80**: 473-481.
- Yang, T.H., Fruekilde, M-B., Xu, X., (2005), Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming, *Food Chemistry*, **92**: 101-107.
- Yassin, A.A.A, Mohamed, I.O., Ibrahim, M.N., Yusoff, M.S.A, (2002), Effect of Enzymatic Interesterification on Melting Point of Palm Olein, *Human Press Inc.*, **110**: 45-52.
- Zainal, Z., Yusoff, M.S.A., (1999), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**: 1003–1008.
- Zaks, A., Klivanov, A.M., (1985), Enzyme-catalyzed processes in organic solvents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 3192-3196.
- Zeijdner, E.E., Houwelling, A.C., Kester, A.D.M., Hornstra, G., (1997), Essencial fatty acid status in plasma phospholipids of mother and neonate after multiple pregnancy, *Prostaglandins, Leuk. Essent. Fatty Acids*, **56**: 395-401.
- Zhang, H., Xu, X., Nilsson, J., Mu, H., Adler-Nissen, J., Hoy, C.-E., (2001), Production of margarine fats by enzymatic interesterification with silica-granulated *Thermomyces lanuginose* lipase in a large-scale study, *J Am Oil Chem Soc.*, **78**: 57–64.

#### Cibergrafia:

- <http://www.lipidnutrition.com/> (ref:510-1-200610) (consultado em Fevereiro de 2009)
- <http://www.lipidnutrition.com/> (ref:540-2-200809) (consultado em Fevereiro de 2009)